



УДК 547.964.4:577.175

© 1990 г.

ПРОСТРАНСТВЕННАЯ СТРУКТУРА D -ORN²-СОДЕРЖАЩИХ ЦИКЛОАНАЛОГОВ ЭНКЕФАЛИНА В РАСТВОРЕ ДИМЕТИЛСУЛЬФОКСИДА

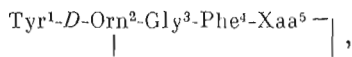
*Шендерович М. Д., Саулитис Ю. Б., Боброва И. В.,
Пучина А. В., Абиссова Н. А., Никифорович Г. В.,
Чипенс Г. И.*

Институт органического синтеза Академии наук ЛатвССР, Рига

С помощью методов теоретического конформационного анализа в приближении жесткой валентной геометрии найдены стерически состоятельные пространственные структуры $\text{cyclo}(2^{\delta} \rightarrow 5)[D\text{-ORN}^2, \text{Pro}^3]$ энкефалина (CE1) и $\text{cyclo}(2^{\delta} \rightarrow 5)[D\text{-ORN}^2, \text{Leu}^3]$ энкефалина (CE2), удовлетворяющие данным спектроскопии ЯМР (випинальные константы спин-спинового взаимодействия, температурные коэффициенты химических сдвигов сигналов амидных протонов, ядерные эффекты Оверхаузера) в растворе диметилсульфоксида. Структуры уточнены с помощью программы молекулярной механики MM2. Оказалось, что как основному *транс*-изомеру CE1 по пептидной связи $\text{Phe}^4\text{-Pro}^5$, так и минорному *цис*-изомеру, обнаруженному в растворе, может быть поставлен в соответствие лишь один определенный тип пространственной структуры пептидного остова: для *транс*-изомера — $\text{FD}^*\text{F}^*\text{AA}$, для *цис*-изомера — $\text{FE}^*\text{D}^*\text{DF}$. В случае менее конформационно жесткого аналога CE2 в растворе может, по-видимому, существовать равновесие конформеров с преобладанием структуры $\text{FD}^*\text{C}^*\text{AA}$. Полученные данные о пространственной структуре аналогов CE1 и CE2 использованы при интерпретации результатов их биологического тестирования на изолированных органах.

Общепринятым является предположение, что молекула энкефалина может обладать при связывании с опиоидными рецепторами δ - и μ -типа различной пространственной структурой (см., например, обзор [1]). В этой связи определение пространственной структуры циклоаналогов энкефалина в растворе можно рассматривать как важный этап исследования конформационно-функциональных отношений опиоидных пептидов и целенаправленного поиска соединений с заданной селективностью действия.

Ранее нами была разработана методика определения пространственной структуры циклических пептидов в растворе с использованием теоретического конформационного анализа и данных спектроскопии ЯМР [2—4]. В настоящей работе этот подход реализован для двух циклических аналогов энкефалина с аминокислотной последовательностью:



где Xaa : Pro, Leu. Синтез, физико-химические и биологические исследования аналога $\text{cyclo}(2^{\delta} \rightarrow 5)[D\text{-ORN}^2, \text{Pro}]$ энкефалина (CE1) выполнены в Институте органического синтеза АН ЛатвССР. Аналог $\text{cyclo}(2^{\delta} \rightarrow 5)[D\text{-ORN}^2, \text{Leu}^3]$ энкефалин (CE2) был синтезирован и исследован ранее двумя группами зарубежных авторов [5, 6].

Теоретический конформационный анализ $\text{cyclo}(2^{\delta} \rightarrow 5)[D\text{-ORN}^2, \text{Pro}^5]$ энкефалина (CE1)

Отбор низкоэнергетических структур CE1 проводился путем минимизации конформационной энергии модельных пептидов, последовательно приближающихся к полной молекуле аналога, и включал четыре основных этапа.

Низкоэнергетические конформации остова

Остаток	Конформа					
	1ц	2ц	3ц	4ц	5ц	6ц
Tyr ¹	F	F	F	F	F	F
D-Orn ²	A*	C*	E*	C*	F*	C*
Gly ³	B	C*	D*	A*	G*	D*
Phe ⁴	D	D	D	A*	A*	A*
Pro ⁵	A	A	F	A	F	F
$E-E_{\min}$, ккал/моль	0,0	1,1	2,2	4,7	6,2	7,7

* Однобуквенные обозначения конформаций остова аминокислотных остатков см. в [7]. Индексы «ц» и «т» при номерах структур указывают *цис*- или *транс*-конформацию пептидной

1. *Ac-D-Ala-Gly-Ala-Pro-Me* — пептид, моделирующий остов циклической части СЕ1, включая С-концевую пептидную группу, образуемую при замыкании цикла. Для отбора конформаций остова, допускающих циклизацию молекулы СЕ1, в целевую функцию минимизации вместе с конформационной энергией E включался штрафной потенциал вида

$$U_{\text{шт}} = U_0(r - r_0)^2, \quad (1)$$

где r — расстояние между атомом C^β остатка *D-Ala* и объединенным «атомом» С-концевого метила, равновесное расстояние $r_0 = 2,5$ А соответствует расстоянию между атомами C^β и C^δ боковой цепи орнитина, а силовая константа U_0 принималась равной 10 ккал/моль·А².

Отдельно рассматривались группы структур с *цис*- и *транс*-конформацией пептидной связи *Ala-Pro*, именуемые в дальнейшем *цис*- и *транс*-изомерами молекулы. Начальные конформации для минимизации целевой функции получены комбинацией локальных минимумов энергии отдельных остатков [7] с учетом некоторых особенностей рассматриваемого модельного фрагмента. Для остатка *D-Ala* учитывались три начальные конформации, различающиеся значениями угла ψ (150, 80 и -40°). Предварительное исследование условий замыкания цикла с помощью процедуры Го и Шерага [8] показало, что точное замыкание цикла с планарными пептидными группами в *транс*-конформации возможно лишь при энергетически менее выгодных отрицательных значениях угла ψ остатка, предшествующего пролину. Поэтому для предпролинового остатка *Ala* к рассматриваемым обычно конформациям с $\psi > 60^\circ$ [7, 9] добавлена начальная конформация $\psi = -60^\circ$, $\phi = -60^\circ$.

Для дальнейших расчетов были отобраны конформации *транс*- и *цис*-изомеров, допускающие замыкание цикла и удовлетворяющие условию $E - E_{\min} < 10$ ккал/моль, где E_{\min} — абсолютный минимум конформационной энергии каждого изомера.

2. *Ac-D-Abu-Gly-Phe-Pro-Me* — соединение, моделирующее циклическую часть молекулы СЕ1 с разорванной валентной связью $C^\gamma-C^\delta$ боковой цепи орнитина. Эта валентная связь и смежные с ней валентные углы были представлены в целевой функции минимизации системой трех штрафных потенциалов вида (1) с $U_0 = 100$ ккал/моль·А² и величинами r_0 , соответствующими расстояниям $C^\beta-C^\delta$, $C^\gamma-C^\delta$ и $C^\delta-N^\delta$ в боковой цепи орнитина. В каждой из конформаций остова, отобранных на предыдущем этапе, последовательным изменением угла χ^1 *D-Abu* и углов χ^1, χ^2 *Phe* с шагом 30° (см. [10]) находили оптимальные начальные конформации боковых цепей *D-Abu* и *Phe*.

3. *D-Orn-Gly-Phe-Pro* — циклическая часть молекулы СЕ1, в ко-

торой точное замыкание цикла обеспечивается двумя штрафными потенциалами, совмещающими атомы C^δ и N^δ боковой цепи орнитина с соответствующими им фиктивными (не взаимодействующими с остальной частью

cyclo(2^δ → 5) [*D*-Orn², Pro⁵]энкефалина (CE1)

цикл остова *							
1т	2т	3т	4т	5т	6т	7т	8т
F	F	F	F	F	F	A	F
A *	E *	D *	F *	A *	C *	E *	A *
A	D *	F *	E *	A	C *	A *	C
G	G	A	A	F	F	E *	E *
C	A	A	C	C	C	C	C
5,7	9,0	12,1	13,0	9,1	9,4	9,6	10,9

связи Phe⁴—Pro⁵.

молекулы) атомами на С-конце остова ($U_0 = 100$ ккал/моль·Å², $r_0 = 0$). На этом этапе расчета были отобраны 13 конформаций *транс*-изомера и 10 конформаций *цис*-изомера, удовлетворяющие условиям $E - E_{\min} \leq 8$ ккал/моль.

4. *Полная молекула CE1*. С учетом симметрии концевой группы NH₃⁺ рассматривались три начальные конформации остова тирозина с углом $\psi = 150, 80$ и -40° при общем начальном значении угла $\varphi = 60^\circ$. Для конформаций цикла с отрицательными значениями угла ψ в *D*-Orn² рассматривались три начальные конформации этого остатка с $\varphi = 150, 80$ и -60° ; при положительных значениях угла ψ стерически разрешен лишь один тип конформаций остова *D*-Orn² ($\varphi \simeq 80^\circ$). Начальные конформации боковых цепей Тур¹ и Phe⁴ выбирались с помощью процедуры, описанной в работе [10] (см. также этап 2).

Результаты расчета свидетельствуют об относительной конформационной подвижности N-концевого участка молекулы CE1. Разность энергий между конформерами этого участка при общей структуре циклической части молекулы обычно не превышает 3 ккал/моль. В свою очередь, некоторые структуры циклической части имеют близкие конформации трипептида 3—5, различаясь лишь конформацией боковой цепи *D*-Orn². В табл. 1 представлены наиболее низкоэнергетические структуры обоих изомеров CE1, различающиеся конформацией остова С-концевого трипептида, с указанием оптимальных конформаций N-концевого дипептида и соответствующих им конформационных энергий. Конформации остова остатков даны в однобуквенных обозначениях Шерага с соавторами (см., например, [7]).

Конформации cyclo(2^δ→5) [*D*-Orn², Pro⁵]энкефалина (CE1) в растворе

Чтобы выделить наиболее вероятные конформации молекулы в растворе, некоторые характеристики спектров ¹H-ЯМР CE1 в (CD₃)₂SO сопоставлены с расчетными низкоэнергетическими конформациями. Полные результаты исследования CE1 методами двумерной спектроскопии ¹H-ЯМР будут опубликованы отдельно.

В растворе (CD₃)₂SO наблюдаются два изомера молекулы CE1 с содержанием 73 и 27%. По наличию ядерного эффекта Оверхаузера (ЯЭО) между α-протонами соседних остатков Phe⁴ и Pro⁵ однозначно определяется *цис*-конформация пептидной связи Phe⁴-Pro⁵ в минорном изомере. *транс*-Конформация пептидной связи Хаа-Pro обычно идентифицируется с помощью ЯЭО между α-протоном остатка Хаа и δ-протонами Pro [11, 12]. В спектре ROESY главного изомера CE1 один из кросс-пиков C^αH(Phe⁴)/C^δH₂(Pro⁵) не может быть выделен из-за близости химических сдвигов протонов, а другой отсутствует. Вместе с тем наблюдаются два кросс-пика ЯЭО NH(Phe⁴)/C^δH₂(Pro⁵). Эти особенности доминирующего

Сопоставление параметров спектров ^1H -ЯМР *транс*- и *цис*-изомеров с уало ($2^{\delta} \rightarrow 5$) [$D\text{-Orn}^2$, Pro^5]энкефалина с характеристиками расчетных конформаций 3т и 3ц

Характеристика	Остаток	Протоны	<i>транс</i> -Изомер		<i>цис</i> -Изомер	
			экспери- мент	расчет	экспери- мент	расчет
$(\Delta\delta/\Delta T) \cdot 10^3$, м. д./К (эксперимент) и S_{NH} , Å^2 (расчет)	$D\text{-Orn}^2$	NH	4,3	2,2	3,9	3,7
		$\text{N}^{\delta}\text{H}$	0,3	0,0	5,4	6,1
	Gly ³ Phe ⁴	NH	4,6	12,1	3,1	5,5
		NH	5,1	3,9	6,0	4,4
$^3J_{\text{HNC}\alpha\text{H}}$, Гц	$D\text{-Orn}^2$ Gly ³		7,3	7,6	6,9	7,6
			6,8	7,6	2,8	0,4
	Phe ⁴		4,5	6,2	8,0	8,8
			4,1	3,3	7,4	7,8
$^3J_{\text{NH}\delta\text{C}\delta\text{H}}$, Гц	$D\text{-Orn}^2$		8,1	8,2	$\Sigma=10,7$	$\Sigma=14,1$
			0	0,4		
Интенсивности ЯЭО (эксперимент) и меж- протонные расстояния, Å (расчет) *	Tyr ¹ $D\text{-Orn}^2$	αN	3	2,3	1	2,3
		αN	3	2,2	1	2,6
	Gly ³	NN	0	3,7	0	4,4
		αN	0	3,0	0	3,5
			3	2,3	1	2,3
	Phe ⁴	NN	0	4,4	0	3,8
		$\text{N}\delta$, $\alpha\alpha$	3	2,2	1	2,1
	Pro ⁵		1	2,5		
		αN	0	3,6	1	2,6

* Приведены ЯЭО и расстояния между протонами $\text{C}_i^{\alpha}\text{H}-\text{N}_{i+1}\text{H}$ (αN), $\text{N}_i\text{H}-\text{N}_{i+1}\text{H}$ (NN), а также $\text{N}_i\text{H}-\text{C}_i^{\delta}\text{H}$ ($\text{N}\delta$) для *транс*-изомера и $\text{C}_4^{\alpha}\text{H}-\text{C}_5^{\alpha}\text{H}$ ($\alpha\alpha$) для *цис*-изомера. Классификацию ЯЭО с интенсивности см. в тексте.

изомера CE1 в $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$ свидетельствуют о *транс*-конформации пептидной связи $\text{Phe}^4 - \text{Pro}^5$ и необычной конформации предпролинового остатка Phe^4 с углом $\psi \lesssim 0^\circ$.

Среди наиболее низкоэнергетических конформаций *транс*-изомера CE1 (табл. 1) имеются структуры как с отрицательными, так и с положительными значениями угла ψ остатка Phe^4 . Только первые из них (конформации 1т—4т) соответствуют наблюдаемым ЯЭО между протонами остатков Phe^4 и Pro^5 доминирующего изомера и могут быть сопоставлены с другими данными ЯМР для уточнения пространственной структуры CE1 в растворе. Такое сопоставление было проведено по трем группам расчетных и экспериментальных параметров:

1) наблюдаемые $\text{HCCB } ^3J_{\text{HNC}\alpha\text{H}}$ (а также $^3J_{\text{NH}\delta\text{C}\delta\text{H}}$ для боковой цепи $D\text{-Orn}^2$) сопоставлялись с величинами, предсказываемыми для расчетных конформаций с помощью зависимости Карлуса—Быстрова [13];

2) температурные коэффициенты $\Delta\delta/\Delta T$ качественно сопоставлялись с площадью доступной растворителю поверхности амидных протонов S_{NH} , рассчитанной с помощью модифицированного алгоритма Ли и Ричардса [14]. При ван-дер-ваальсовых радиусах Бонди [15] и пробной сфере, моделирующей молекулу воды (подробнее см. в [4]), величины S_{NH} для полностью доступных растворителю амидных протонов составляют $\sim 10 \text{ Å}^2$, а для полностью экранированных от растворителя протонов близки к нулю;

3) межпротонные расстояния в расчетных конформациях сопоставлялись с полуколичественной оценкой интенсивностей ЯЭО, полученной отнесением кросс-пиков спектра ROESY к классам 1, 2 и 3 с последовательно возрастающей интенсивностью (ненаблюдаемые ЯЭО относятся к нулевому классу интенсивности).

Из низкоэнергетических структур 1т—4т лишь конформация 3т хорошо согласуется с имеющимися данными ^1H -ЯМР для доминирующего

изомера СЕ1 (см. табл. 2). В этой конформации единственный полностью экранированный от растворителя амидный протон $N^{\delta}H$ ($D\text{-Orn}^2$) образует водородную связь с карбонильной группой того же остатка, максимальное расхождение расчетных и экспериментальных величин КССВ составляет 1,7 Гц: наиболее интенсивным ЯЭО соответствуют межпротонные расстояния 2,2—2,3 Å, а ненаблюдаемым ЯЭО — 3,0 Å и более. Для конформации циклической части молекулы типа 3т расчет предсказывает четыре близких по энергии конформера остова N-концевого участка со значениями углов $\psi_1 \simeq 150$ и -50° , $\varphi_2 \simeq 150$ и 80° . Однако интенсивный кросс-пик ЯЭО $C^{\alpha}H$ (Tyr^1)/ $NH(D\text{-Orn}^2)$ указывает на предпочтительность положительных значений ψ_1 , а конформации с $\varphi_2 \simeq 80^\circ$ предсказывают водородную связь $Tyr^1CO\dots NH\ Gly^3$, которая должна экранировать амидный протон Gly^3 от растворителя. Таким образом, наиболее вероятной структурой *транс*-изомера СЕ1 в $(CD_3)_2SO$ является конформация 3т с вытянутым N-концевым участком молекулы ($\psi_1 \simeq 150^\circ$, $\varphi_2 \simeq 150^\circ$).

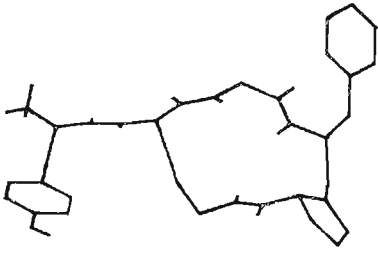
Сравнительно низкое содержание *цис*-изомера не позволяет провести полуколичественную классификацию интенсивностей кросс-пигов ЯЭО. В этом случае расчетные межпротонные расстояния сопоставляются с однозначно установленным наличием или отсутствием некоторых ЯЭО (классы интенсивности 1 и 0 в табл. 2). Низкоэнергетическая конформация 3ц — единственный вариант пространственной структуры *цис*-изомера СЕ1, согласующийся с данными ЯМР (см. табл. 2). Все амидные протоны в этой конформации доступны растворителю. Конформация 3ц достаточно точно воспроизводит наблюдаемые КССВ ${}^3J_{HN^{\delta}C^{\alpha}H}$. При этом в согласии с экспериментом для α -протона Gly^3 с высокой КССВ предсказывается интенсивный ЯЭО с амидным протоном Phe^4 ($d_{\alpha N} = 2,3$ Å), а для α -протона Gly^3 с низкой КССВ — отсутствие такого ЯЭО ($d_{\alpha N} = 3,5$ Å). Расхождение расчетной и наблюдаемой сумм КССВ ${}^3J_{HN^{\delta}C^{\alpha}H}$ $D\text{-Orn}^2$ (табл. 2) уменьшается после уточнения конформации 3ц с помощью процедуры MM2 (см. ниже). Как и в случае *транс*-изомера, результаты расчета предсказывают для конформации циклической части типа 3ц несколько близких по энергии конформеров N-концевого участка молекулы. У *цис*-изомера наибольшим весом, по-видимому, обладает вытянутая конформация этого участка с $\psi_1 \simeq 150^\circ$ и $\varphi_2 \simeq 150^\circ$, так как именно она предсказывает интенсивный кросс-пик ЯЭО $C^{\alpha}H(Tyr^1)/NH(D\text{-Orn}^2)$ и сравнительно доступный растворителю амидный протон $D\text{-Orn}^2$.

Стерически напряженная конформация остова дипептида $Phe^4\text{—}Pro^5$ в *транс*-изомере СЕ1 ограничивает конформационную подвижность боковой цепи фенилаланина узким интервалом $\chi^1 \simeq -150 \div -120^\circ$. Оценочные значения КССВ ${}^3J_{HC^{\alpha}C^{\beta}H}$ (2,5 и 7,2 Гц), полученные усреднением по кривой Де Марко с соавт. [16] в предположении равномерного распределения χ^1 Phe^4 в указанном интервале, качественно согласуются с наблюдаемыми величинами (4,8 и 7,7 Гц). Конформации боковой цепи Phe^4 в *цис*-изомере и боковой цепи Tyr^1 в обоих изомерах изменяются достаточно свободно.

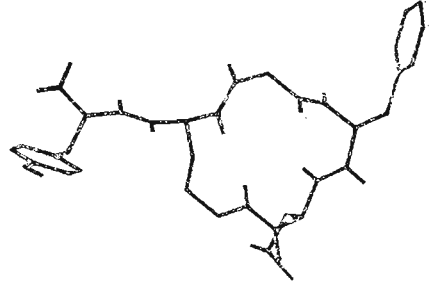
Таким образом, из нескольких вариантов пространственной структуры *транс*- и *цис*-изомера СЕ1, полученных минимизацией конформационной энергии молекулы в пространстве углов внутреннего вращения при фиксированных длинах связей и валентных углах, можно выделить две конформации, каждая из которых удовлетворяет обширному набору данных спектроскопии 1H -ЯМР: для *транс*-изомера — конформацию остова FD^*FAA , для *цис*-изомера — FE^*D^*DF . Стереопереизображения этих конформаций представлены на рис. 1.

Конформации $cys(10^{2\delta} \rightarrow 5)$ ($D\text{-Orn}^2$, Leu^5) энкефалина (СЕ2) в растворе

Кесслер с соавт. [5] методами спектроскопии ЯМР в растворе $(CD_3)_2SO$ исследовали циклический аналог энкефалина (СЕ2), отличающийся от СЕ1 лишь одной аминокислотой в положении 5. В работе [5] не приведены данные о ядерных эффектах Оверхаузера, но сопоставление величин



а



а

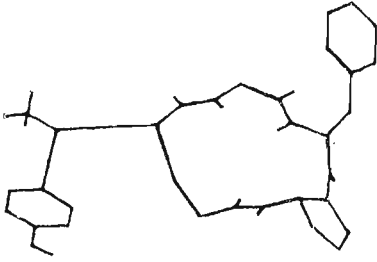


Рис. 1.

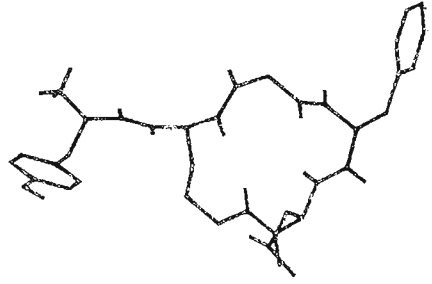
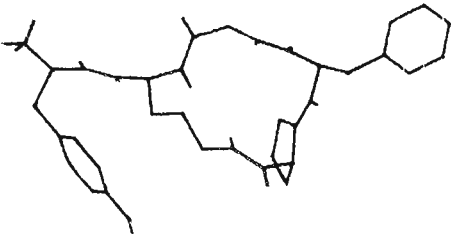
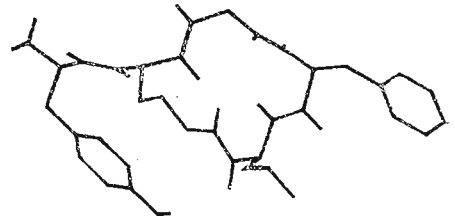


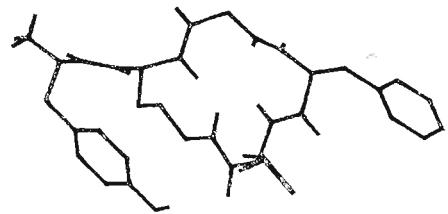
Рис. 2



б



б



Сопоставление параметров спектров ^1H -ЯМР $\text{cyclo}(2^{\delta} \rightarrow 5)[D\text{-Orn}^2, \text{Leu}^5]$ энкефалина [5] с расчетными характеристиками двух моделей пространственной структуры молекулы

Характеристика	Остаток	Эксперимент	Конформация 1 (расчет)	Конформация 2 (расчет)
$(\Delta\delta/\Delta T) \cdot 10^3$, м. д./К (эксперимент) и S_{NH} , Å ² (расчет)	$D\text{-Orn}^2$ NH	2,9	2,1	4,7
	N ⁶ H	-0,8	0,0	0,1
	Gly ³	5,4	12,5	12,6
	Phe ⁴	6,7	5,4	4,4
	Leu ⁵	-1,4	0,0	0,0
$^3J_{\text{HNC}^{\alpha}\text{H}}$, Гц	$D\text{-Orn}^2$	7,4	7,4	7,8
	Gly ³	6,3	8,4	8,2
		4,7	2,9	4,6
	Phe ⁴	5,9	7,1	7,4
	Leu ⁵	9,9	7,8	5,4
$^3J_{\text{HN}^{\delta}\text{C}^{\delta}\text{H}}$, Гц	$D\text{-Orn}^2$	~9 <1	6,8 0,7	5,0 1,7

КССВ и температурных коэффициентов $\Delta\delta/\Delta T$ амидных протонов СЕ2 и *транс*-изомера СЕ1 указывает на сходство пространственной структуры обеих молекул. К дополнительным особенностям молекулы СЕ2 можно отнести высокую КССВ $^3J_{\text{HNC}^{\alpha}\text{H}}$ и низкий температурный коэффициент амидного протона остатка Leu⁵. Мы попытались установить пространственную структуру СЕ2 в $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$ путем минимизации энергии (третий и четвертый этапы описанной выше схемы расчета) двух типов начальных конформаций СЕ2:

1) конформации, близкие к найденной выше структуре *транс*-изомера СЕ1;

2) конформации, базирующиеся на модели пространственной структуры СЕ2, предложенной Кесслером с соавт. [5] на основании данных ЯМР. Эта модель также содержит водородную связь $D\text{-Orn}^2$ N⁶H...OC $D\text{-Orn}^2$, но отличается от *транс*-изомера СЕ1 конформацией остатка Phe⁴, образующего γ -изгиб, замкнутый водородной связью Leu⁵ NH...OC Gly³.

Расчетные характеристики двух конформаций СЕ2, представляющих каждую из этих моделей (конформации 1 соответствует структура остова FD*C*AA, конформации 2 — FE*F*CG), сопоставляются с данными ЯМР в табл. 3. Конформация 1, близкая к найденной в предыдущем разделе конформации *транс*-изомера СЕ1, достаточно хорошо воспроизводит наблюдаемые КССВ и согласуется с экспериментальными величинами $\Delta\delta/\Delta T$ в оценке относительной доступности растворителю амидных протонов. Амидные протоны N⁶H $D\text{-Orn}^2$ и NH Leu⁵, имеющие низкий температурный коэффициент $\Delta\delta/\Delta T$, могут в этой конформации образовывать водородную связь с CO $D\text{-Orn}^2$. Конформация Phe⁴ с $\psi < 0^\circ$ не является в случае СЕ2 стерически напряженной, и структура 1 обладает низкой конформационной энергией. Конформация 2 содержит обе предлагаемые в работе [5] водородные связи, но плохо воспроизводит экспериментальное значение КССВ $^3J_{\text{HNC}^{\alpha}\text{H}}$ Leu⁵. Это обстоятельство не было, вероятно, замечено авторами работы [5] при моделировании пространственной структуры СЕ2 с помощью моделей Дрейдинга. Попытка изменения

Рис. 1. Стереонизображения наиболее вероятных конформаций $\text{cyclo}(2^{\delta} \rightarrow 5)[D\text{-Orn}^2, \text{Pro}^5]$ энкефалина (СЕ1) в растворе $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$. а — *транс*-изомер; б — *цис*-изомер

Рис. 2. Стереонизображения конформаций, соответствующих двум моделям пространственной структуры $\text{cyclo}(2^{\delta} \rightarrow 5)[D\text{-Orn}^2, \text{Leu}^5]$ энкефалина (СЕ2) в растворе $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$. а — конформация 1; б — конформация 2

в конформации 2 угла ϕ_{Leu^5} в сторону увеличения $J_{\text{HNC}^{\alpha}\text{H}}$ приводит либо к значительным стерическим напряжениям, либо к переходу в конформацию 1. Кроме того, в приближении фиксированной валентной геометрии конформация 2 проигрывает по энергии конформации 1 около 9 ккал/моль. Стереобразия обеих конформаций SE2 даны на рис. 2.

Таким образом, из двух рассмотренных моделей пространственной структуры циклической части SE2 конформация 1 стерически более предпочтительна и лучше согласуется с данными ЯМР. Нециклический N-концевой участок молекулы SE2, как и в случае SE1, обладает, как показали расчеты, сравнительно высокой конформационной подвижностью.

Уточнение конформаций циклических аналогов энкефалина методом молекулярной механики

Конформационные расчеты в приближении фиксированных длин связей и валентных углов достаточно хорошо описывают пространственную структуру SE1 в растворе. Однако соотношение энергий двух изомеров молекулы оказывается существенно искаженным. Заселенности *транс*- и *цис*-изомеров SE1 в $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$ составляют 73 и 27%, что соответствует разности свободных энергий менее 1 ккал/моль в пользу *транс*-изомера. По данным расчета, конформационная энергия *транс*-изомера, напротив, значительно выше, чем энергия *цис*-изомера. Замыкание цикла связано с локальными стерическими напряжениями в молекуле SE1, приводящими в случае *транс*-изомера к невыгодной конформации остатка Phe^4 , а в случае *цис*-изомера — к непланарной конформации пептидной группы $\text{Phe}^4\text{—Pro}^5$ ($\omega \simeq -40^\circ$). Можно предположить, что подобные стерические напряжения частично снимаются небольшими изменениями валентных углов и конформации пирролидинового кольца пролина. С целью проверки этого предположения и уточнения пространственной структуры SE1 была проведена минимизация энергии атом-атомных взаимодействий конформаций 3т и 3ц в пространстве декартовых координат атомов с помощью программы MM2.

Значения углов внутреннего вращения в начальных и уточненных конформациях SE1 приведены в табл. 4. Конформации всех остатков обоих изомеров SE1 остаются после уточнения с помощью программы MM2 в окрестностях прежних локальных энергетических минимумов, хотя изменения отдельных углов внутреннего вращения достигают 20—30°. Эти изменения имеют в основном компенсаторный характер и не отражаются на общей пространственной структуре молекулы. Так, в *цис*-изомере локальные напряжения, приводившие к непланарной конформации пептидной группы $\text{Phe}^4\text{—Pro}^5$, снимаются за счет коррелированного изменения углов внутреннего вращения ϕ_4 , ω_4 и ϕ_5 . Изменение углов ϕ остатка Gly^3 в *цис*-изомере и остатка Phe^4 в *транс*-изомере приводит к некоторому увеличению разности между предсказываемыми и наблюдаемыми значениями $J_{\text{HNC}^{\alpha}\text{H}}$, хотя качественное согласие расчетных и экспериментальных КССВ сохраняется. С другой стороны, изменение угла χ^4 боковой цепи $D\text{-Ora}^2$ при уточнении конформации *цис*-изомера приводит, как уже упоминалось, к лучшему согласию расчетной и наблюдаемой сумм КССВ ${}^3J_{\text{HN}\delta\text{C}^{\beta}\text{H}}$ (12,7 и 10,7 Гц соответственно).

Наиболее существенный результат уточнения конформаций SE1 с помощью программы MM2 — снижение разности энергий *транс*- и *цис*-изомера. *цис*-Изомер остается энергетически более предпочтительным, но разность конформационных энергий двух изомеров составляет теперь 3,4 ккал/моль, в основном за счет различия в значениях торсионных потенциалов. Дополнительный расчет с помощью программы MM2 был проведен также для конформации 1ц (табл. 1), соответствующей в приближении фиксированной валентной геометрии абсолютному минимуму энергии, но не согласующейся с данными ЯМР. Уточненная энергия этой конформации на 3 ккал/моль превышает энергию структуры, моделирующей *цис*-изомер, и близка к энергии *транс*-изомера SE1. Таким образом, обе конформации табл. 4 относятся к наиболее низкоэнергетическим кон-

Углы внутреннего вращения наиболее вероятных структур циклических аналогов энкефалина в растворе $(CD_3)_2SO^*$

Остаток	Углы, град	CE1				CE2					
		цис-Изомер		транс-Изомер		Конформа-ция 1		Конформа-ция 1а		Конформа-ция 2	
		ЕСЕРР	ММ2	ЕСЕРР	ММ2	ЕСЕРР	ММ2	ЕСЕРР	ММ2	ЕСЕРР	ММ2
Tyr ¹	φ	-63	-56	-61	-55	-61	-54	-60	-54	-63	-57
	ψ	151	154	151	137	153	140	154	141	148	146
	ω	180	179	180	177	180	177	180	177	180	179
	χ ¹	61	61	178	178	178	180	178	180	59	59
	χ ²	89	86	-116	-106	69	80	63	73	88	85
	χ ³	0	3	0	0	1	2	0	-10	0	-1
D-Orn ²	φ	151	155	151	159	152	159	153	160	149	151
	ψ	-176	175	-104	-91	-107	-110	-97	-97	-118	-150
	ω	177	-179	-168	-172	-175	-175	-176	-175	-173	-173
	χ ¹	-69	-68	171	164	174	176	169	176	-51	-50
	χ ²	-164	-168	141	141	130	132	130	137	-129	-139
	χ ³	69	67	-92	-77	-64	-63	-62	-74	84	86
Gly ³	φ	145	168	78	61	58	61	55	51	69	89
	ψ	-102	-100	-146	-149	-128	-139	-126	-136	-154	-163
	ω	-172	-175	179	178	-175	178	180	175	178	179
	φ	-149	-157	-62	-51	-86	-58	-81	-62	-88	-71
	ψ	94	66	-54	-59	-12	-50	-20	-48	54	62
	ω	-45	-4	-165	-176	180	-179	-168	180	-174	-173
Phe ⁴	χ ¹	-61	-61	-126	-120	-179	-173	180	-173	-59	-53
	χ ²	73	-79	90	-84	67	70	87	83	-61	-76
	φ	-75	-90	-75	-64	-91	-57	-94	-78	-165	-178
	ψ	-178	-164	-40	-48	-27	-50	-14	44	-57	-64
	ω	176	172	179	-178	180	-178	-178	-179	178	-175
	χ ¹	19	44	19	27	-58	-60	-60	-54	177	175
Leu ⁵ (CE2)	χ ²	-14	-38	-14	35	159	176	154	173	62	60
	Энергия E-E _{мин} , ккал/моль **	2,2	0,0	12,0	3,4	0,0	0,0	0,5	1,8	9,2	3,7

* Для каждого типа структуры приведены конформации, полученные минимизацией энергии в приближении фиксированной валентной геометрии с потенциалами ЕСЕРР и с помощью программы ММ2.

** E_{мин} — минимальное значение энергии, полученное для данного пептида в данном расчетном приближении.

формациям CE1, а на реальное соотношение их статистических весов в растворе существенное влияние оказывают, очевидно, растворитель и энтропийные факторы.

Минимизация энергии с помощью программы ММ2 была проведена также для конформаций CE2, соответствующих двум описанным выше моделям пространственной структуры молекулы. Разность энергий между обеими моделями в приближении варьируемой валентной геометрии снижается до 2—4 ккал/моль (см. табл. 4). При этом в конформации 2 происходят коррелированные изменения смежных углов остова ψ_i , ψ_{i+1} , не сопровождающиеся значительным изменением пространственной структуры и предсказываемых параметров ЯМР. Минимизация энергии структуры типа 1 с помощью программы ММ2 приводит, однако, к более существенным изменениям конформации остова С-концевого участка молекулы. Чтобы оценить устойчивость процедуры, минимизацию проводили из двух начальных конформаций этого типа: 1 (представлена в табл. 3 и на рис. 2а) и близкой к ней 1а. Две результирующие структуры не идентичны и различаются в основном значениями углов внутреннего вращения ψ Leu⁵ и χ^4 D-Orn² (см. табл. 4), т. е. ориентацией С-концевой пептидной группы.

Соответствующие этим структурам КССВ ${}^3J_{\text{HN}^{\delta}\text{C}^{\delta}\text{H}}$ остатков Phe⁴, Leu⁵ и $J_{\text{HN}^{\delta}\text{C}^{\delta}\text{H}} D\text{-Orn}^2$ значительно хуже согласуются с экспериментальными данными, чем величины, предсказываемые исходными конформациями 1 и 1а.

Таким образом, в случае стерически менее стесненного циклопептида СЕ2 процедура ММ2 с используемой в настоящей работе системой потенциалов не приводит к уточнению пространственной структуры молекулы в растворе.

Обсуждение результатов

Опыт теоретического конформационного анализа молекулы СЕ1 показывает, что расчет в приближении фиксированной валентной геометрии достаточно хорошо описывает пространственную структуру в случае небольших стерически напряженных циклопептидов. Однако близкое к реальному соотношение энергий отдельных конформеров дает лишь расчет, включающий варьирование валентной геометрии. Поскольку минимизация конформационной энергии в пространстве декартовых координат атомов связана со значительными затратами машинного времени, можно рекомендовать для небольших циклопептидов стратегию расчета, применяемую в настоящей работе: предварительное сканирование пространства углов внутреннего вращения при фиксированной валентной геометрии с последующим уточнением небольшого числа отобранных конформаций при помощи процедуры типа ММ2.

Хорошее согласие расчетных конформаций с экспериментальными данными свидетельствует о значительной конформационной жесткости циклической части СЕ1. Единственная существенная конформационная перестройка циклической части молекулы в $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$ связана с *транс-цис*-изомеризацией пептидной связи Phe⁴—Pro⁵. 15-Членный пролинсодержащий цикл СЕ1 допускает, по-видимому, лишь два строго определенных варианта замыкания, один из которых включает в себя невыгодную по локальным стерическим условиям конформацию остатка Phe⁴, другой — *цис*-конформацию пептидной связи Phe⁴—Pro⁵. Пространственная структура СЕ1 слабо зависит от обычно столь существенного фактора, как природа растворителя: эксперимент показал, что относительная заселенность изомеров и ряд их ЯМР-параметров в H₂O незначительно отличаются от наблюдаемых в $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$.

Из двух рассмотренных в настоящей работе моделей пространственной структуры СЕ2 конформация 1 (табл. 4), близкая к конформации *транс*-изомера СЕ1, обладает минимальной энергией и лучше согласуется с экспериментальными данными. Однако, поскольку в отличие от СЕ1 цикл СЕ2 стерически менее напряжен, в растворе может существовать равновесие конформеров с преобладанием структуры типа 1.

По данным расчета в приближении жесткой валентной геометрии, в предпочтительных структурах СЕ2 остаток Phe⁴ принимает конформацию $\varphi = -80 \div -90^\circ$, $\psi = -10 \div -20^\circ$ и образует вместе с остатком Gly³ β-изгиб типа 1, стабилизируемый водородной связью Leu⁵ NH...OC D-Orn². Дополнительная водородная связь между N^δH и OC D-Orn² образуется при сходной конформации остатка Leu⁵. Однако при минимизации энергии с помощью программы ММ2 конформации остатков 4 и 5 смещаются в область $\varphi \simeq -60^\circ$, $\psi \simeq -50^\circ$ (конформация 1, табл. 4) или в область положительных значений угла ψ (остаток Leu⁵ в конформации 2а, табл. 4). Подобные изменения, приводящие к ослаблению обеих внутримолекулярных водородных связей и отклонению расчетных КССВ ${}^3J_{\text{HN}^{\delta}\text{C}^{\delta}\text{H}}$ остатков Phe⁴ и Leu⁵ от наблюдаемых величин, связаны, по-видимому, с несовершенством используемой в настоящей работе системы потенциальных функций ММ2 (см. «Экспериментальную часть»). Согласующиеся с экспериментальными данными конформации остатков Phe⁴ и Leu⁵ соответствуют в этой системе потенциалов сравнительно высокому энергетическому барьеру (~3 ккал/моль), разделяющему области положительных и отрицательных значений угла ψ. Наличие подобного барьера объясняет неустойчивость результатов минимизации при небольшом изменении начальной конфор-

Ингибиторная способность (IC_{50}) аналогов энкефалина, исследованная на препаратах подвздошной кишки морской свинки (GPI) и семявыводящем протоке мыши (MVD)

Соединение	GPI		MVD		Селективность $\frac{IC_{50} (MVD)}{IC_{50} (GPI)}$
	IC_{50} , нмоль	Относительная активность, %	IC_{50} , нмоль	Относительная активность, %	
CE1	8860±1700	3,2	29 000±5000	0,06	3,3
CE2	354±62	80,5	5000±300	0,4	14,1
Морфин	78±19	365	579±244	3,4	7,4
[Leu ⁵]энкефалин	285±80	100	20±1	100	0,07

мации и противоречит как данным квантово-химических расчетов модельных дипептидов, так и относительной распространенности β -изгибов ($\psi_{i+2} \approx 0^\circ$) в пептидах и белках [17]. Отметим, что в используемом варианте потенциалов ЕСЕРР (см. «Экспериментальную часть») небольшой энергетический барьер при $\psi \approx 0^\circ$ не препятствует стабилизации β -изгибов. Локализация энергетического минимума А (область правой α -спирали), по-видимому, также не вполне точна в используемых потенциалах MM2: предпочтительные значения $\phi \approx -60^\circ$ соответствуют, согласно зависимости [13], низким, редко наблюдаемым у пептидов $KCCB \ ^3J_{HN\alpha H} \approx 3$ Гц.

Таким образом, в отличие от напряженных циклов типа CE1 для конформационного анализа пептидов, у которых замыкание цикла не вызывает заметных стерических ограничений, адекватное описание потенциальной поверхности является, по-видимому, более существенным фактором, чем варьирование валентной геометрии.

Результаты тестирования биологической активности аналогов CE1 и CE2 представлены в табл. 5 в сопоставлении с данными, полученными в тех же условиях для морфина и [Leu⁵]энкефалина. На препарате семявыводящего протока мыши, содержащего опиоидные рецепторы δ -типа, аналог CE1 практически неактивен, а аналог CE2 обладает лишь следовой активностью. Сродство CE2 к μ -рецепторам, оцененное по величине IC_{50} на препарате подвздошной кишки морской свинки, близко к сродству [Leu⁵]энкефалина (по данным работы [6], даже в 5 раз выше, чем у [Leu⁵]энкефалина). Невысокое, но достоверное сродство к μ -рецепторам проявляет также аналог CE1 (3% относительно [Leu⁵]энкефалина или $\sim 1\%$ относительно морфина).

Оба циклических аналога энкефалина являются, таким образом, умеренными селективными агонистами рецепторов μ -типа. Подобная селективность связана, возможно, с ограниченной конформационной подвижностью этих пептидов: оба аналога могут принимать конформацию, необходимую для связывания с μ -рецепторами, а конформация, комплементарная к δ -рецепторам, оказывается запрещенной или стерически напряженной. Сходство конформации *транс*-изомера CA1 и предпочтительной конформации CE2 в $(CD_3)_2SO$ (рис. 3) позволяет предположить, что именно этот тип пространственной структуры циклической части обоих пептидов реализуется при связывании с μ -рецепторами. С учетом относительной конформационной подвижности N-концевого участка каждый пептид имеет несколько низкоэнергетических конформеров с данной структурой цикла. Таким образом, в настоящей работе получены наборы вероятных конформаций связывания CE1 и CE2 с μ -рецепторами, которые в дальнейшем

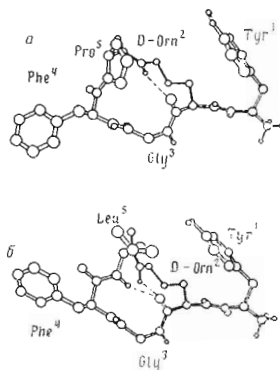


Рис. 3. Сопоставление наиболее вероятных конформаций *транс*-изомера CE1 (а) и молекулы CE2 (б) в растворе $(CD_3)_2SO$

могут быть использованы в качестве эталонов при исследовании конформационно-функциональных отношений аналогов энкефалина.

Экспериментальная часть

Расчет конформационной энергии в приближении фиксированных длин связей и валентных углов проводился на ЭВМ HP 1000 с использованием стандартной геометрии пептидов и потенциальных функций программы ЕСЕРР [18, 19]. Минимизация энергии осуществлялась в пространстве углов внутреннего вращения ϕ , ψ , ω и χ (см. [20]). Пирролидиновое кольцо пролина фиксировалось в конформации «down» [18]. Электростатические взаимодействия рассчитывались при диэлектрической постоянной $\epsilon = 47$, соответствующей диметилсульфоксиду — растворителю, в котором получены используемые в настоящей работе данные спектроскопии ЯМР. N-Концевая аминогруппа считалась ионизированной.

Минимизация конформационной энергии в пространстве декартовых координат атомов проводилась с помощью программы молекулярной механики MM2 [21]. Параметры атом-атомных потенциалов были заимствованы из работы [22], где их использовали для уточнения данных рентгеноструктурного анализа белков. Для взаимодействий с участием атомов ароматических колец приняты согласующиеся с остальными параметрами MM2 потенциалы, предложенные в работе [23]. Электростатические взаимодействия рассчитывались с диэлектрической постоянной $\epsilon = 1,5$.

Биологическое тестирование ингибиторной способности морфина, [Leu⁵]энкефалина, а также циклоаналогов CE1 и CE2 на изолированных органах проводилось по методике, описанной в работе [24].

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Hansen P. E., Morgan B. A. // *The Peptides: Analysis, Synthesis, Biology*. V. 6 / Eds Udenfriend S., Meienhofer J. N. Y.: Acad. Press, 1984. P. 269—316.
2. Шендерович М. Д., Секацис И. П., Лиешинь Э. Э., Никифорович Г. В., Панычевич О. С. // *Биоорганическая химия*. 1985. Т. 11. № 9. С. 1180—1191.
3. Шендерович М. Д., Саулитис Ю. Б., Никифорович Г. В. // *Межмолекулярные взаимодействия и конформации молекул*. Пушкино: Научный центр биологических исследований АН СССР, 1987. С. 110—114.
4. Shenderovich M. D., Nikiforovich G. V., Saulitis J. B., Chipens G. I. // *Biophys. Chem.* 1988. V. 31. № 1—2. P. 163—173.
5. Kessler H., Hölzemann G., Zechel C. // *Int. J. Peptide and Protein Res.* 1985. V. 25. № 3. P. 267—279.
6. Di Maio J., Nguyen T. M.-D., Lemeux C., Schiller P. W. // *J. Med. Chem.* 1982. V. 25. № 12. P. 1432—1438.
7. Zimmerman S. S., Scheraga H. A. // *Biopolymers*. 1977. V. 16. № 4. P. 811—843.
8. Go N., Scheraga H. A. // *Macromolecules*. 1970. V. 3. № 2. P. 178—187.
9. Ахрем А. А., Голубович В. П., Курнарский Л. И., Никифорович Г. В., Шерман С. А., Шендерович М. Д., Галактионов С. Г., Цейтлин В. М. // *Докл. АН БССР*. 1977. Т. 21. № 1. С. 38—41.
10. Никифорович Г. В., Шендерович М. Д., Балодис Ю. Ю. // *Биоорганическая химия*. 1981. Т. 7. № 2. С. 179—188.
11. Быстров В. Ф. // *Биоорганическая химия*. 1984. Т. 10. № 8. С. 997—1003.
12. Саулитис Ю. Б., Лиешинь Э. Э., Секацис И. П., Шендерович М. Д., Мутулис Ф. К., Мутуле И. Э., Чипенс Г. И. // *Биоорганическая химия*. 1985. Т. 11. № 8. С. 1013—1025.
13. Bystrov V. F., Ivanov V. T., Portnova S. L., Balashova T. A., Ovchinnikov Yu. A. // *Tetrahedron*. 1973. V. 29. № 6. P. 873—877.
14. Lee B., Richards F. M. // *J. Mol. Biol.* 1971. V. 55. № 3. P. 379—400.
15. Bondi A. // *J. Phys. Chem.* 1964. V. 68. № 3. P. 441—451.
16. De Marco A., Llinás M., Wüthrich K. // *Biopolymers*. 1978. V. 17. № 3. P. 617—633.
17. Chuman H., Momany F. A., Schäfer L. // *Int. J. Peptide and Protein Res.* 1984. V. 24. № 3. P. 233—248.
18. Momany F. A., McGuire R. F., Burgess A. W., Scheraga H. A. // *J. Phys. Chem.* 1975. V. 79. № 22. P. 2361—2381.
19. Nemethy G., Pottle M. C., Scheraga H. A. // *J. Phys. Chem.* 1983. V. 87. № 11. P. 1883—1887.
20. IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature // *Pure Appl. Chem.* 1974. V. 40. № 3. P. 291—308.
21. Буркерт У., Эллинджер Н. *Молекулярная механика*. М.: Мир, 1986.

22. Levitt M., Lifson S. // J. Mol. Biol. 1969. V. 46. № 2. P. 269—279.
23. Beckhaus H.-D. // Chem. Ber. 1983. V. 116. № 1. P. 86—89.
24. Боброва И. В., Абиссова Н. А., Розенталь Г. Ф., Никифорович Г. В., Чипенс Г. И. // Биоорганич. химия. 1985. Т. 11. № 11. С. 1457—1467.

Поступила в редакцию
12.IV.1988

SPACE STRUCTURE OF *D*-Orn²-CONTAINING ENKEPHALIN
CYCLOANALOGUES IN DIMETHYLSULPHOXIDE SOLUTION

SHENDEROVICH M. D., SAULITIS J., BOBROVA I. V., PUCHINA A. V.,
ABISSOVA N. A., NIKIFOROVICH G. V., CHIPENS G. I.

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

The sterically acceptable structures of cyclo(2^δ → 5)[*D*-Orn², Pro⁵]- and cyclo(2^δ → 5)[*D*-Orn², Leu⁵]enkephalin (CE1 and CE2) consistent with NMR data including coupling constants, temperature dependencies of chemical shifts for amide protons and NOE values have been found by use of energy calculations in terms of rigid valence geometry and refined by the MM2 procedure. It has been shown that the major *trans*-isomer (with respect to Phe⁴—Pro⁵ bond) of CE1 in solution corresponds only to the FD*F*AA type of peptide backbone, and the minor *cis*-isomer of CE1 corresponds only to the FE*D*DF type. The less conformationally rigid CE2 analogue apparently exists in solution in the dynamic conformational equilibrium with preference of FD*C*AA type of the backbone structure. The obtained data on CE1 and CE2 space structures have been used for interpreting results of their biological testing.