



УДК 547.962 : 541.63

© 1990 г.

*Е. М. Попов, Н. М. Годжаев\*, Н. А. Ахмедов\*,  
Е. В. Сулейманова\**

## СТРУКТУРНАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ МОЛЕКУЛ [Met]ЭНКЕФАЛИНА И ЭНДОРФИНОВ I. ТЕОРЕТИЧЕСКИЙ КОНФОРМАЦИОННЫЙ АНАЛИЗ [Met]ЭНКЕФАЛИНА

*Всесоюзный заочный институт пищевой промышленности, Москва;*

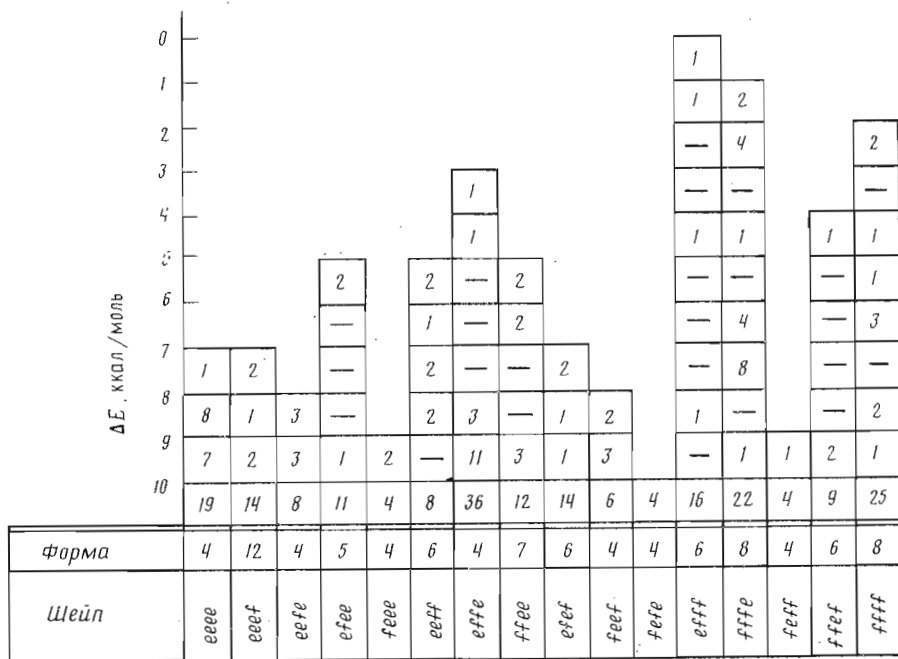
*\* Азербайджанский государственный университет им. С. М. Кирова, Баку*

Методом теоретического конформационного анализа на основе оптимальных конформаций соответствующих аминокислотных остатков исследованы структура и конформационные возможности молекулы [Met]энкефалина. Найдены низкоэнергетические конформации гормона, значения двугранных углов основной и боковых цепей, оценена энергия внутри- и межостаточных взаимодействий.

Выделению эндогенных нейропептидов непосредственно предшествовало открытие в начале 70-х годов в нервной ткани рецепторов, избирательно связывающих морфин, кодеин и другие экзогенные опиаты [1—3]. Следовательно, дальнейший поиск велся целенаправленно: в его основе лежала идея о необходимости существования эндогенных лигандов для обнаруженных стереоспецифических мест узнавания. Первое доказательство наличия таких лигандов в организме удалось получить Теренису и Вальстрему [4] с помощью радиорецепторного анализа. Практически одновременно Хюджес [5] выделил из экстрактов мозговой ткани свиньи вещество, обладающее аналогичным морфину анальгетическим действием. Найденный опиоподобный фактор содержал два пентапептида, различающихся только С-концевой аминокислотой [6]. Они были названы [Met]- и [Leu]энкефалинами. Оказалось, что последовательность [Met]энкефалина содержится в структуре аденогипофизарного пептида β-липотропина, обнаруженного и идентифицированного ранее в ткани гипофиза нескольких видов животных [7, 8].

Открытие энкефалинов стимулировало поиск других лигандов опиатных рецепторов. Почти одновременно было обнаружено несколько пептидных опиоподобных по своему действию веществ, названных эндорфинами [9—12]. Они также оказались фрагментами β-липотропина. Вскоре были выделены и синтезированы гексадека- и гептадекапептидные α- и γ-эндорфины [13, 14], которые являются фрагментами состоящего из 31 аминокислотного остатка β-эндорфина, соответствующего в свою очередь последовательности С-концевой части β-липотропина. Позднее был выделен δ-эндорфин, представляющий собой по структуре нонадекапептидный участок β-эндорфина [15].

Прогресс в области синтеза нейропептидов и их аналогов создал в короткий срок совершенно новую основу для изучения их функций. Вначале преимущественное внимание, естественно, уделялось исследованию анальгетического эффекта гормонов и их влияния на психический и неврологический статус организма [16]. Было показано, что энкефалины и эндорфины обладают помимо обезболивающего действия также эйфорогенными и подкрепляющими свойствами [17—21], проявляют ярко выраженный эффект наркотического антагониста налуксона при хронической шизофрении и хронических психозах [22]. Появились сообщения, указывающие на их



Распределение рассчитанных оптимальных конформаций [Met]энкефалина по энергии, формам и шейпам (во второй строке снизу цифры указывают количество рассмотренных форм данного шейпа)

участие в регуляции висцеральной системы организма, обменных процессов, системы пищеварения, функции поджелудочной железы и гипотензивном воздействии на сердечно-сосудистую систему [23].

Полифункциональность энкефалинов и эндорфинов свидетельствует о конформационной лабильности молекул [24, 25], необходимой для комплементарной подстройки их пространственного строения к активным центрам различных рецепторов. Складывается представление, что одинаковый у всех эндорфинов [Met]энкефалиновый участок ответствен за реализацию многих функций, а количественный эффект и его продолжительность зависят от длины последующей пептидной цепи [9, 26, 27]. Так, длительность анальгезии заметно и систематически снижается в ряду  $\beta$ ,  $\delta$ ,  $\gamma$ ,  $\alpha$ -эндорфинов и [Met]энкефалина; действие  $\beta$ -эндорфина по сравнению с морфином значительно продолжительнее и для того же эффекта требует в десятки раз меньших доз [10, 28, 29].

Цель настоящей работы заключалась в теоретическом изучении структурной организации [Met]энкефалина,  $\alpha$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$  и  $\beta$ -эндорфинов. В первом сообщении обсуждаются результаты конформационного анализа [Met]-энкефалина, во втором представлены результаты исследования пространственных структур  $\alpha$ -,  $\gamma$ - и  $\delta$ -эндорфинов. В третьей статье рассмотрена аналогичная задача для  $\beta$ -эндорфина. Структурная организация молекул [Met]энкефалина,  $\alpha$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$  и  $\beta$ -эндорфинов исследована на основе развитых в работах Попова [30—32] конформационной теории и соответствующего расчетного метода в предположении жесткой валентной схемы молекулы. Используемые в расчете потенциальные функции и полуэмпирические параметры для оценки невалентных, электростатических, торсионных взаимодействий и водородных связей указаны в работах [30—33].

При изложении результатов использована предложенная в сообщениях [19, 20] классификация пептидных структур на конформации, формы и шейпы. Для обозначения конформаций применена система идентификаторов, согласно которой конформационное состояние каждого остатка определяется через  $X_{ij}^n$ , где X характеризует форму основной цепи остатка (R, B, L, P), n — номер остатка в последовательности, а символы  $ij =$

$= 11, 12, 13, 21$  и т. д. отвечают положениям боковой цепи ( $\chi^1, \chi^2, \chi^3$ ); индекс 1 соответствует значениям углов в области  $0-120^\circ$ , индекс 2 — области  $120-120^\circ$ , а индекс 3 — области  $-120-0^\circ$ . Кроме того, основная цепь характеризуется шейпом или структурным типом, описываемым сочетанием символов  $f$  и  $e$ , которые обозначают соответственно свернутую и развернутую конфигурацию виртуальных связей  $C_i^\alpha - C_{i+1}^\alpha - C_{i+2}^\alpha - C_{i+3}^\alpha$ . Обозначения и отсчеты углов вращения соответствуют номенклатуре, приведенной в работе [34].

Набор начальных структурных вариантов Tyr-Gly-Gly-Phe-Met ([Met]-энкефалина) формировался исходя из геометрии оптимальных конформаций отдельных аминокислотных остатков и оптимальных конформаций предварительно рассчитанного нами дипептида Phe<sup>4</sup>-Met<sup>5</sup>. Всего было получено 202 исходных конформационных состояния с 92 различными формами основной цепи, принадлежащими 16 шейпам, т. е. всем возможным в самом общем случае для пентапептида. На рисунке представлено энергетическое распределение конформаций, полученных после минимизации энергии при вариации двугранных углов  $\phi, \psi, \omega$  и  $\chi$  всех остатков. Из приведенной гистограммы следует, что пентапептидные конформации различных типов, образованные из самых выгодных состояний остатков, существенно различаются по энергии. Дифференциация оптимальных структур молекулы имеет место не только по шейпам, но и по формам основной цепи и конформационным состояниям. Для [Met]энкефалина низкоэнергетические конформации принадлежат шейпам *efff* ( $B_{213}BPR_{23}B_{212}$ ;  $\Delta E = 0$  ккал/моль), *ffe* ( $B_{232}LPB_{23}R_{222}$ ;  $\Delta E = 1,5$ ), *ffff* ( $B_{232}PRB_{23}L_{322}$ ;  $\Delta E = 2, 4$ ), *effe* ( $B_{133}BPB_{21}B_{212}$ ;  $\Delta E = 3,5$ ), *ffef* ( $B_{112}LLB_{21}L_{322}$ ;  $\Delta E = 4,1$ ). В скобках приведены лучшие конформации каждого типа и величины относительной энергии. Предпочтительность для данной последовательности структур со свернутой основной цепью по сравнению с развернутой достаточно очевидна, поскольку только в этом случае сближенными оказываются боковые цепи Tyr<sup>1</sup> и Phe<sup>4</sup>, Met<sup>5</sup>. Шейпы пептидного остова *efff*, *ffe*, *ffff*, *effe* и *ffef* предоставляют возможность для образования в условиях плотнейшей упаковки стабилизирующих контактов между N- и C-концевыми остатками. Об этом можно судить по величинам энергии межостаточных взаимодействий Tyr с Phe и Met (табл. 1).

Следует отметить, что у последовательности [Met]энкефалина, имеющей два смежных остатка Gly, энергетически выгодное свертывание основной цепи осуществляется не за счет  $\alpha$ -спиральных R-форм остатков, а путем комбинации иных форм, различных у разного типа структур. Так, например, самая лучшая  $\alpha$ -спиральная конформация полностью свернутого шейпа *ffff* с формой основной цепи *RRRRR* уступает  $\sim 6$  ккал/моль наиболее выгодной конформации этого же шейпа с формой *BPRBL*.

В табл. 2 для низкоэнергетических конформаций пяти шейпов приведены величины энергетических вкладов в конформационную энергию от дисперсионных ( $E_{\text{нв}}$ ), электростатических ( $E_{\text{ст}}$ ) и торсионных взаимодействий ( $E_{\text{торс}}$ ) и водородных связей ( $E_{\text{вс}}$  включена в  $E_{\text{нв}}$ ). Таблица интересна тем, что демонстрирует неодинаковую природу стабилизирующих сил у конформаций разных шейпов и, следовательно, указывает на возможность эффективного воздействия внешних факторов на положение конформационного равновесия. Глобальная конформация [Met]энкефалина ( $\Delta E = 0$ ) наиболее компактна, так как имеет минимальную энергию дисперсионных взаимодействий. Следующая за ней конформация шейпа *ffe* ( $\Delta E = 1,5$ ) предпочтительнее по энергии электростатических взаимодействий и водородных связей. Расчет проведен нами применительно к условиям полярной среды с использованием диэлектрической проницаемости  $\epsilon = 10$  и энергии оптимальной водородной связи  $E_{\text{вс}} = -1,5$  ккал/моль. При переходе к неполярной среде и гидрофобному окружению уменьшается  $\epsilon$  и увеличивается  $E_{\text{вс}}$ . Так, при  $\epsilon = 4$  и  $E_{\text{вс}} = 3,0$  ккал/моль положение конформационного равновесия смещается в сторону структур шейпов *ffe* и *ffff*, которые становятся предпочтительнее *efff* соответственно на 3,0 и 1,0 ккал/моль. Таким образом, расчет

Энергия внутри- и межостаточных взаимодействий (ккал/моль) в оптимальных конформациях молекулы [Met]энкефалина (сверху вниз)  $B_{213}BPR_{23}B_{212}$  ( $\Delta E = 0$  ккал/моль),  $B_{232}LPB_{23}R_{222}(1,5)$ ,  $B_{232}PRB_{23}L_{322}(2,4)$ ,  $B_{133}BPB_{21}B_{212}(3,5)$ ,  $B_{112}LLB_{21}L_{322}(4,0)$

	Tyr <sup>1</sup>	Gly <sup>2</sup>	Gly <sup>3</sup>	Phe <sup>4</sup>	Met <sup>5</sup>
Tyr <sup>1</sup>	1,3	-1,7	-3,1	-1,7	-8,8
	1,4	-1,9	-0,6	-3,8	-8,8
	1,4	-1,6	-1,2	-3,4	-9,7
	2,1	-1,2	-2,0	-3,0	-6,8
Gly <sup>2</sup>	3,9	-0,3	-0,8	-5,8	-10,8
		1,5	-0,3	-1,6	-2,4
		1,3	-0,3	-1,8	0
		1,3	-0,3	-0,8	-0,2
Gly <sup>3</sup>		1,2	0,2	-1,5	0
		1,3	0,2	-1,3	0
			1,3	-0,9	-0,7
			1,3	-1,3	-0,4
Phe <sup>4</sup>			1,3	-1,0	-0,3
			1,3	-0,9	-0,3
			1,2	-0,4	-0,5
				-0,2	-2,1
Met <sup>5</sup>				0,6	-3,4
				0	-3,4
				-0,1	-3,7
				0	-2,2
					0,7
					1,1
					2,1
					1,1
					1,6

Таблица 2

Относительная энергия ( $\Delta E$ ) и энергетические вклады невалентных ( $E_{нв}$ ), электростатических ( $E_{эл}$ ) и торсионных ( $E_{торс}$ ) взаимодействий у предпочтительных оптимальных конформаций молекулы [Met]энкефалина

№	Шейп	Конформация	Конформационная энергия, ккал/моль			
			$\Delta E$	$E_{нв}$	$E_{эл}$	$E_{торс}$
1	<i>efff</i>	$B_2BPR_1B_{212}$	0	-19,7	1,0	3,8
2		$B_2BPR_2R_{212}$	1,8	-17,5	1,2	3,2
3		$B_2BPR_2B_{232}$	4,6	-15,7	1,7	3,7
4	<i>fjje</i>	$B_2LPB_2R_{222}$	1,5	-15,4	-1,4	3,5
5		$B_2LPB_2B_{222}$	1,8	-15,5	-1,2	3,6
6		$B_2PRB_2R_{222}$	2,8	-14,0	-1,2	3,2
7		$B_2PRB_2B_{222}$	3,0	-14,2	-1,0	3,3
8		$B_1PRB_2R_{222}$	2,5	-15,1	0,1	2,6
9		$B_1PRB_2B_{222}$	2,3	-15,3	0,3	2,5
10	<i>ffff</i>	$B_2PRB_2L_{322}$	2,4	-14,9	-1,1	3,5
11		$B_2LPB_2L_{322}$	2,7	-14,2	-1,2	3,1
12		$B_2LPB_2B_{212}$	3,0	-14,1	-1,0	3,1
13		$B_2PRR_2B_{322}$	4,9	-15,6	2,5	3,2
14	<i>effe</i>	$B_1BPB_2B_{212}$	3,5	-17,8	3,8	2,6
15	<i>ffef</i>	$B_1LLB_2L_{322}$	4,0	-13,2	-0,6	2,9

приводит к заключению о мобильности структурной организации молекулы [Met]энкефалина, обусловленной альтернирующим характером внутримолекулярных взаимодействий. Изменение внешних условий может приводить к перераспределению конформаций в шкале энергии. Следует, однако, подчеркнуть, что при этом никаких новых конформаций в наборе низкоэнергетических состояний не возникает. Расчет показал, что структурные варианты, существенно уступающие лучшим конформациям по

Двугранные углы (град) в оптимальных конформациях  $B_2BPR_2B_{212}$  ( $\Delta E = 0$  ккал/моль; 1-я строка),  $B_2LPB_2R_{222}$  ( $\Delta E = 1,5$ ; 2-я строка),  $B_2PRB_2L_{322}$  ( $\Delta E = 2,4$ ; 3-я строка),  $B_1BPR_2B_{212}$  ( $\Delta E = 3,5$ ; 4-я строка) и  $B_1LLB_2L_{322}$  ( $\Delta E = 4,0$ ; 5-я строка) [Met]энкефалина

Остаток	Основная цепь			Боковая цепь			
	$\varphi$	$\psi$	$\omega$	$\chi^1$	$\chi^2$	$\chi^3$	$\chi^4$
Tyr <sup>1</sup>	-59	140	-175	-168	90	0	
	-171	148	-178	-177	-101	-179	
	-50	144	177	-177	-101	180	
	-93	158	-179	50	-96	0	
	-132	144	180	62	92	180	
Gly <sup>2</sup>	-151	81	172				
	78	75	-175				
	81	-77	-177				
	-86	92	174				
	54	48	180				
Gly <sup>3</sup>	82	-77	-174				
	82	-73	174				
	-76	-45	-176				
	90	-66	179				
	55	35	180				
Phe <sup>4</sup>	-91	-41	-172	178	-113		
	-67	148	-179	180	-109		
	-155	137	-175	-176	-114		
	-139	148	-179	180	71		
	-155	108	180	171	77		
Met <sup>5</sup>	-156	151	-	-171	60	-178	60
	-63	-55	-	-174	175	180	60
	46	65	-	-70	-179	170	57
	-73	122	-	-174	58	-179	60
	47	79	-	-66	178	-178	60

величинам  $\Delta E$ , проигрывают последним также по энергии всех видов взаимодействий. Поэтому вариация внешних условий не может сместить положение равновесия в их сторону и сделать актуальными в биологическом акте; важное для функционирования пептида перераспределение имеет место только в пределах набора низкоэнергетических конформаций. Значения двугранных углов  $\varphi$ ,  $\psi$ ,  $\omega$  основной цепи и углов  $\chi$  боковых цепей у пяти самых выгодных пространственных структур шейпов *efff*, *fffe*, *ffff*, *effe* и *ffef* приведены в табл. 3.

Сопоставим теперь полученные нами результаты с имеющимися экспериментальными данными о пространственном строении [Met]энкефалина и результатами теоретического конформационного анализа других авторов.

В первом структурном исследовании [Met]энкефалина методом <sup>1</sup>H-ЯМР Роквес и соавт. [35, 36] пришли к заключению, что предпочтительная в растворе диметилсульфоксида (DMSO) конформация основной цепи молекулы включает так называемый  $\beta_1$ -изгиб [37] со сближенными концевыми группами N<sup>+</sup>H<sub>3</sub> и COO<sup>-</sup> и водородной связью между NH Met<sup>5</sup> и CO Gly<sup>2</sup>. В предложенной структуре большой конформационной свободой обладают дипептидный участок Tyr<sup>1</sup>-Gly<sup>2</sup> и боковые цепи Tyr<sup>1</sup>, Phe<sup>4</sup>, Met<sup>5</sup>, которые ориентированы в среду и не взаимодействуют ни друг с другом, ни с пептидным остовом. Существенный довод в пользу такой структуры авторы видят в близком морфину расположении группы N<sup>+</sup>H<sub>3</sub> и фенольного кольца. Стремление соблюсти структурное подобие нейропептида и морфина привело Бредбэри и соавт. [38] к другой молекулярной модели [Met]энкефалина.

[Met]энкефалин исследован также методом протонного ядерного резонанса [39]. В сообщении [39] не исключается наличие для пептида в раст-

ворах DMSO и H<sub>2</sub>O конформаций разных форм, но доминирующей считается свернутая структура, аналогичная постулированной в работах [35, 36], однако предполагается, что при этой форме пептидного остова каждая из боковых цепей Tyr<sup>1</sup>, Phe<sup>4</sup> и Met<sup>5</sup> представлена, причем со значительным весом, тремя вращательными изомерами. Следовательно, у молекулы [Met]-энкефалина, согласно [39], возможна реализация 27 приблизительно равновероятных конформаций, имеющих одну форму основной цепи. Разница в энергии ротамеров близка к величине  $RT$ , а скорость конверсии  $10^{-10}$  —  $10^{-11}$  с. В работе [39], как и в [36, 37], отмечается сходство спектров ЯМР энкефалина в растворах DMSO и H<sub>2</sub>O.

Более детально конформационные возможности молекулы [Met]-, а также [Leu]энкефалина были изучены Халедом и соавт. [40] методами <sup>1</sup>H- и <sup>13</sup>C-ЯМР, УФ-, КД-спектроскопии при различных температурах в большом наборе растворителей и широком интервале концентраций. Показано, что спектральные свойства, используемые для структурной идентификации пептидов, существенно зависят от температуры, природы растворителя и концентрации. Все отмеченные в спектрах изменения авторы связали с реализацией в растворе двух конформационных состояний энкефалина, отвечающих свободной и ассоциированной формам молекул [40]. Пептидная цепь мономера представляет собой β<sub>1</sub>-изгиб с остатками Gly<sup>3</sup> и Phe<sup>4</sup> в центре поворота цепи и водородной связью между NH Met<sup>5</sup> и CO Gly<sup>2</sup>.

Такая модель согласуется с предположениями работ [35, 36, 39] и противоречит данным [38, 41, 42].

Новые элементы модели — дополнительные две водородные связи (Gly<sup>3</sup>), NH...OC (Tyr<sup>1</sup>) и (Tyr<sup>1</sup>) OH...OC (Gly<sup>3</sup>), закрепляющие основную и боковую цепи тирозина. Кроме того, N-конец молекулы стабилизирован эффективными взаимодействиями фенольного кольца, нависающего над свернутой основной цепью. В работах [35, 36, 39] остаток Tyr<sup>1</sup>, напротив, предполагается свободным, что обосновывается экспериментальными данными и физиологической целесообразностью. В концентрированных растворах молекулы энкефалина димеризованы, образуя антипараллельную β-структуру с соответствующей системой водородных связей.

Несколько ранее публикации [40] стали известны результаты первого теоретического конформационного анализа [Met]энкефалина, проведенного Де Коэнном и соавт. [43]. На основе расчета 400 структурных вариантов молекулы, сформированных путем комбинации конформационных состояний свободных остатков, отвечающих минимумам на соответствующих картах φ — ψ, выделены 15 конформаций с относительной энергией 0—3,0 ккал/моль. Они имеют как свернутые, так и полностью развернутые формы основной цепи, причем вторые более предпочтительны. В наборе низкоэнергетических конформаций на предпоследнем месте оказалась структура с β<sub>1</sub>-изгибом, предложенная в работах [35, 36, 39] на основе данных ЯМР. Ввиду крайне упрощенной методики расчета, исключаящей реальную оценку межостаточных взаимодействий, прежде всего боковых цепей и их пространственной ориентации, выводы работы [43] трудно считать достаточно обоснованными. Использованный неконтролируемый подход к выбору исходных конформационных состояний остатков и отсутствие минимизации энергии по углам внутреннего вращения не гарантируют от пропуска действительно низкоэнергетических структур [Met]энкефалина и от ошибочного конформационного распределения по величинам энергии.

Более тщательный теоретический анализ [Met]энкефалина выполнен Изагаем и соавт. [44]. Найденная глобальная конформация молекулы ( $\Delta E = 0$ ) имеет свернутую форму с β<sub>2</sub>-изгибом и центральными остатками Gly<sup>3</sup>-Phe<sup>4</sup>. Она стабилизирована невалентными взаимодействиями элементов основной цепи и водородной связью между группами OH тирозиновой боковой цепи и CO Gly<sup>3</sup> или Phe<sup>4</sup>. Боковые цепи остатков Met и Phe ориентированы в среду и конформационно свободны. Аналогичную форму имеют еще шесть конформаций с энергией 0,2—3,0 ккал/моль, различающихся положением боковых цепей. Расчет [44] в основном согласуется с данными ЯМР [35, 36, 39, 40], подтверждая предпочтительность для

молекулы [Met]энкефалина в разбавленном растворе конформаций одной формы основной цепи.

Геометрия глобальной структуры, полученной в работе [44], полностью совпадает с найденной нами независимо самой выгодной конформацией молекулы не только по шейпу пептидного скелета (*eff*), но и по форме и ориентациям боковых цепей ( $B_{213}BPR_{23}B_{212}$ ). Более того, имеется вполне удовлетворительное количественное совпадение двугранных углов  $\varphi$ ,  $\psi$ ,  $\omega$  и  $\chi$  всех остатков (средний разброс не превышает  $8^\circ$ ). Рассчитанные в сообщении [44] структурные варианты иных типов имеют существенно более высокую энергию. Так, относительная энергия лучшей конформации типа *effe* (в нашей классификации), непосредственно следующей за глобальной, составляет 5,4 ккал/моль. Найденная же нами количественно точно такая в отношении всех деталей конформация имеет энергию 3,5 ккал/моль. Различие не так существенно, однако важно другое. Согласно нашему расчету, между конформациями шейпов *efff* и *effe* ( $\Delta E = 0$  и 3,5 ккал/моль) находятся конформации еще двух типов (*fffe* и *ffff*), лучшие из которых имеют энергии 1,5 и 2,4 ккал/моль.

По данным расчета Изоган и соавт. [44], самые низкоэнергетические структуры этих типов характеризуются значениями  $\Delta E$  соответственно около 6,0 и 11,0 ккал/моль. Причина состоит в выбранной в работе [44] стратегии анализа. Полностью свернутая структура (*ffff*) представлена в рассмотренном наборе лишь  $\alpha$ -спиральной формой, которая и по нашим данным очень невыгодна для последовательности [Met]энкефалина. Другие же формы спирального типа, оказавшиеся в этом случае более предпочтительными, в работе [44] не проанализированы. Из всех возможных вариантов шейпа *fffe* рассмотрены структуры только с формой основной цепи *BPRBB*, а самые низкоэнергетические структуры этого типа, имеющие по нашим данным, форму *BLPBR*, во внимание также приняты не были. Таким образом, вывод авторов [44] о доминирующем содержании в растворе конформации *efff* [Met]энкефалина не отражает реальную ситуацию, а является следствием значительных пропусков в наборе исходных конформационных состояний.

Недавние физиологические испытания *D*-Ala<sup>2</sup>- и *D*-Ala<sup>3</sup>-аналогов [Met]-энкефалина [45—47] показали, что активность у первого соединения выше в несколько раз, чем у природного нейропептида, а у второго практически отсутствует. Если установленная экспериментально [35, 36, 39, 40] и рассчитанная априорно [44] глобальная конформация шейпа *efff* действительно ответственна за взаимодействие с опиатным рецептором, то замена Gly<sup>2</sup> на *D*-Ala<sup>2</sup>, учитывая данные [45—47], не должна привести к существенному изменению ее геометрии и величины относительной энергии.

Расчет, однако, показал, что это не так [48]. Глобальной у [*D*-Ala<sup>2</sup>, Met<sup>5</sup>]энкефалина является конформация другого типа, именно *fffe*, а конформация *efff*, самая выгодная для природного пентапептида, обладает заметно большей энергией. В свете этих данных, казалось бы, вполне оправданно предположение о том, что конформация *efff* не имеет отношения к активному центру опиатного рецептора. Но это только на первый взгляд. Поскольку в работе [44], на основе результатов которой было проведено исследование [48], не рассматривались все возможные типы структур, а у каждого типа — все возможные формы основной цепи, вывод автора [48] лишен достаточно строгого обоснования. Самая предпочтительная конформация шейпа *efff* могла иметь не *BBPRB*-форму, а, например, не рассмотренную в [44] форму *RLPRB*, также не противоречащую известным опытным данным. При замене Gly<sup>2</sup> на *D*-Ala<sup>2</sup> она осталась бы глобальной у [*D*-Ala<sup>2</sup>, Met<sup>5</sup>]энкефалина, а при той же замене Gly<sup>3</sup> стала бы нереальной для *D*-Ala<sup>3</sup>-аналога. В этом случае для объяснения результатов физиологических испытаний [45—47] пришлось бы сделать утверждение, прямо противоположное сделанному в [48].

Что же касается конкретных результатов расчета, то они достаточно очевидны. В рассматриваемой конформации [Met]энкефалина остаток Gly<sup>2</sup> находится в состоянии *B*. Для остатка *D*-Ala оно крайне невыгодно, поскольку энергетически эквивалентно состоянию *P* для *L*-Ala, которое,

как известно, не обнаруживается в структурах пептидов и белков ни у одного из остатков, за исключением симметричного глицина. В структуре же шейпа *fffe*, следующей за *efff* и имеющей, согласно нашим данным, форму *BLPBR*, замена *Gly* на *D-Ala*<sup>2</sup> не ведет к повышению энергии, и поэтому она становится глобальной.

Последующее экспериментальное изучение пространственного строения [Met]энкефалина и его взаимодействий с опиатными рецепторами свидетельствовало о значительно более сложной, чем предполагалось ранее, структурно-функциональной организации нейропептида. Спиртс и соавт. [49], исследовав спектры УФ и КД [Met]энкефалина в растворе в интервалах температур 5—50° С и значений рН 1—12, пришли к заключению о чрезвычайной внутренней подвижности молекулы, для которой характерен весьма представительный набор равновероятных и легко переходящих друг в друга конформаций. Выбор функциональной структуры индуцируется в процессе взаимодействия энкефалина с рецепторным центром.

Вывод о значительной подвижности всех боковых цепей и пептидного скелета и быстром изменении конформационного состояния [Met]энкефалина был сделан также в работе [50] на основе данных <sup>13</sup>С-ЯМР-спектроскопии. Заключение [49, 50] противоречат, однако, результатам исследования внутримолекулярной подвижности нейропептида, проведенного релаксационным методом ЯМР «вращающегося каркаса» [51].

Нагашияма и соавт. [52], изучив <sup>1</sup>Н- и <sup>13</sup>С-ЯМР-спектры [Met]энкефалина с использованием эффекта Оверхаузера, пришли к выводу, что опытные данные не подтверждают предположения о преимущественной структуре с β-изгибом и внутримолекулярными водородными связями. В работе [53] на основе данных <sup>1</sup>Н-ЯМР авторы утверждают, что наиболее предпочтительны для [Met]энкефалина в водной среде вытянутые вдоль пептидных связей конформации. В кристалле, согласно рентгеноструктурному анализу [Leu]энкефалина [54], молекула имеет свернутую форму с водородной связью между карбонильным кислородом *Tyr*<sup>1</sup> и амидным водородом *Phe*<sup>4</sup>.

Рассматривая далее исследования структуры [Met]энкефалина последних лет, мы вынуждены были бы продолжить перечень различных, часто противоречивых, а то и взаимоисключающих точек зрения на конформационное состояние молекулы, его зависимость от внешних факторов и характер связи с опиатной и другими функциями. В настоящее время, как и ранее, отсутствует единое мнение в отношении пространственного строения природного нейропептида, количество его предпочтительных конформаций, их энергии и геометрии. Не установлена связь хотя бы одной структуры с функцией. Тем не менее, по-видимому, не будет ошибкой, обобщая накопленный за последние годы интенсивных исследований экспериментальный материал, сделать вывод о наличии у энкефалина большой конформационной свободы и возможности реализации структур различных шейпов. Такой вывод подтверждается также полученными нами результатами теоретического конформационного анализа.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Pert C. B., Snyder S. H.* // *Science*. 1973. V. 179. P. 1011—1014.
2. *Simon E. I., Hiller J. M., Eldeman I.* // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. 1973. V. 70. № 9. P. 1947—1949.
3. *Terenius L.* // *Acta pharmacol. et toxicol.* 1973. V. 33. № 2. P. 377—384.
4. *Terenius L., Wahlstrom A.* // *Acta pharmacol. et toxicol.* 1974. V. 35, № 1. P. 55—57.
5. *Hughes J., Smith T. W., Morgan B., Toth L.* // *Life Sci.* 1975. V. 16. № 8. P. 1753—1758.
6. *Hughes J., Smith T. W., Kosterlitz H. W.* // *Nature*. 1975. V. 258. № 3. P. 577—579.
7. *Li C. H.* // *Nature*. 1964. V. 201. P. 924—925.
8. *Li C. H., Chung D.* // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. 1976. V. 73. № 10. P. 1145—1148.
9. *Cox B. M., Goldstein A., Li C. H.* // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. 1976. V. 73. P. 1821—1823.
10. *Goldstein A.* // *Science*. 1976. V. 193. № 4. P. 1081—1086.
11. *Graf L., Ronai A. Z., Bajusz S.* // *FEBS Lett.* 1976. V. 64. № 1. P. 181—185.
12. *Techemacher H., Ophelm K. E., Cox B. M., Goldstein A.* // *Life Sci.* 1976. V. 16. № 8. P. 1771—1775.



13. *Ling N., Guillemain R.* // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1976. V. 73. № 14. P. 3308—3310.
14. *Ling N., Burgus R., Guillemain R.* // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1976. V. 73. № 21. P. 3942—3946.
15. *Szekely J. L., Ronai A. Z., Zsusa D. K., Graf L., Bajusz S.* // Experientia. 1977. V. 33. № 1. P. 54—55.
16. *Mayer D. J., Price D. D., Rafii A.* // Brain Res. 1977. V. 121. № 2. P. 368—372.
17. *Bloom F., Segal D., Ling N., Guillemain R.* // Science. 1975. V. 194. № 3. P. 630—632.
18. *Jacquet Y. F., Marks N.* // Science. 1976. V. 194. № 3. P. 632—634.
19. *Pert A., Sivit C.* // Nature. 1977. V. 265. № 4. P. 645—647.
20. *Walker J. M., Bernson G. G., Sandman C. A., Coy D. H., Schally A. V., Kastin A. J.* // Science. 1976. V. 196. № 1. P. 85—86.
21. *Li C. H., Tseng L., Ferrara P., Yamashiro D.* // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1978. V. 75. № 23. P. 4306—4309.
22. *Terenius L., Wahlström A., Lindström L., Widerlöv E.* // Neurosci. Lett. 1976. V. 3. № 1. P. 157—162.
23. *Смагин В. Г., Виноградов В. А., Булгаков С. А.* Лиганды опиагных рецепторов. М.: Наука, 1983. 272 с.
24. *Jones C. R., Gibbons W. A., Garsky V.* // Nature. 1976. V. 262. № 5. P. 779—782.
25. *Bewley T. A., Li C. H.* // Biochemistry. 1983. V. 22. № 12. P. 2671—2675.
26. *Ferrara P., Li C. H.* // Int. J. Peptide and Protein Res. 1980. V. 16. № 1. P. 66—69.
27. *Deakin J. F. W., Doströvsky J. A., Smyth D. G.* // Biochem. J. 1980. V. 189. № 2. P. 501—506.
28. *Marx J. L.* // Science. 1976. V. 193. № 5. P. 1227—1230.
29. *Ашмарин И. П.* // Журн. эвол. биохимии и физиол. 1977. Т. 13. № 3. С. 570—578.
30. *Ропов Е. М.* // Int. J. Quant. Chem. 1979. V. 16. № 4. P. 707—737.
31. *Попов Е. М.* // Физика молекул. Т. 8. Киев: Наук. думка, 1980. С. 69—113.
32. *Попов Е. М.* // Молекуляр. биология. 1985. Т. 19. № 3. С. 1107—1138.
33. *Akhmedov N. A., Akhverdiana G. A., Godjaev N. M., Popov E. M.* // Int. J. Peptide and Protein Res. 1986. V. 27. № 1. P. 95—111.
34. IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature // Biochim. et biophys. acta. 1971. V. 229. № 1. P. 1—17.
35. *Roques B. P., Garbay-Jaureguiberry C., Oberlin R., Anteunis M., Lala A. K.* // Nature. 1976. V. 262. № 5. P. 778—779.
36. *Garbay-Jaureguiberry C., Roques B. P., Oberlin R., Anteunis M., Lala A. K.* // Biochem. and Biophys. Res. Commun. 1976. V. 71. № 3. P. 558—565.
37. *Anteunis M., Lala A. K., Garbay-Jaureguiberry C., Roques B. P.* // Biochemistry. 1977. V. 16. № 7. P. 1462—1466.
38. *Bradbury A. F., Smyth D. G., Snell C. R.* // Nature. 1976. V. 260. № 2. P. 165—166.
39. *Jones C. R., Gibbons W. A., Garsky V.* // Nature. 1976. V. 262. № 5. P. 779—782.
40. *Khaled M. A., Long M. M., Thompson W. D., Bradley R. J., Brown G. B., Urry D. W.* // Biochem. and Biophys. Res. Commun. 1977. V. 76. № 2. P. 224—231.
41. *Bleich H. E., Cutnell J. D., Day A. R., Freer R. J., Glasel J. A., McKelvey J. F.* // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1976. V. 73. P. 2589—2593.
42. *Bleich H. E., Day A. R., Freer R. J., Glasel J. A.* // Biochem. and Biophys. Res. Commun. 1977. V. 74. № 3. P. 592—598.
43. *De Coen J. L., Humblet C., Koch M. N.* // FEBS Lett. 1977. V. 73. № 1. P. 38—42.
44. *Isogai Y., Nemethy G., Scheraga H. A.* // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1977. V. 74. P. 414—418.
45. *Terenius L., Wahlström A., Lindeberg G., Karlsson S., Ragnarsson U.* // Biochem. and Biophys. Res. Commun. 1976. V. 71. № 1. P. 175—179.
46. *Pert C. B., Pert A., Chang J. K., Fong B. T. W.* // Science. 1976. V. 194. № 2. P. 330—332.
47. *Coy D. H., Kastin A. J., Schally A. V., Morin O., Caron N. G., Labrie F., Walker J. M., Fertel R., Bernson G. G., Sandman C. A.* // Biochem. and Biophys. Res. Commun. 1976. V. 73. № 3. P. 632—638.
48. *Momany P. A.* // Biochem. and Biophys. Res. Commun. 1977. V. 75. № 5. P. 1098—1103.
49. *Sprites M. A., Schwartz R. W., Mattice W. L., Coy D. H.* // Biochem. and Biophys. Res. Commun. 1978. V. 81. № 3. P. 602—609.
50. *Deslauriers R., Tancrede P., McGregor W. H., Sarantakis D., Somorja R. L., Smyth J. C. P.* // Nucl. Magn. Resonance Spectroscopy Mol. Biol. Proc., 11th Jerusalem symp., 1978. P. 285—295.
51. *Bleich H. E., Day A. R., Freer R. J., Glasel J. A.* // Biochem. and Biophys. Res. Commun. 1979. V. 87. № 6. P. 1146—1153.
52. *Higashijima T., Kobayashi J., Nagai U., Miyazawa T.* // Eur. J. Biochem. 1979. V. 97. № 1. P. 43—57.
53. *Levin B. A., Rabenstein D. L., Smyth D., Williams R. J. P.* // Biochim. et biophys. acta. 1979. V. 579. № 2. P. 279—290.
54. *Smith C. D., Griffen J. F.* // Science. 1978. V. 199. № 6. P. 1214—1216.

Поступила в редакцию  
12.IV.1989  
После доработки  
19.VII.1989

STRUCTURAL ORGANIZATION OF THE [Met]ENKEPHALIN  
AND ENDORPHINS MOLECULES.

I. THEORETICAL CONFORMATIONAL  
ANALYSIS OF [Met]ENKEPHALIN

*All-Union Institute for Food Industry, Moscow;*  
*\* S. M. Kirov Azerbaijan State University, Baku*

Using a semi-empirical method, an a priori conformational analysis of the [Met]-enkephalin molecule was carried out. Calculations yielded the values of all dihedral angles of the backbone and side chains of the peptide's forms as well as intra- and inter-residue interaction energies.