



УДК 547.96 : 541.6

КОНФОРМАЦИОННЫЕ СОСТОЯНИЯ БРАДИКИНИНА И ЕГО АНАЛОГОВ В РАСТВОРАХ

II. СПЕКТРЫ ФЛУОРЕСЦЕНЦИИ

Ефремов Е. С., Филатова М. П., Реутова Т. О.,
Степанова Л. Н., Рейсмани З.**, Иванов В. Т.*

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

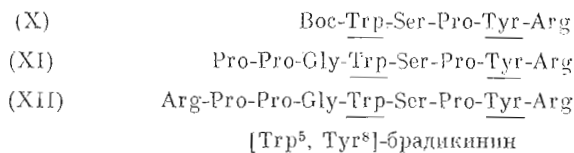
Исследованы спектры флуоресценции производных брадикинина и его укороченных аналогов с флуоресцентными метками в первом (Dns), пятом и восьмом (Phe, Tyr, Trp) положениях. По эффективности безызлучательного переноса энергии измерены межхромофорные расстояния 1—5, 1—8 и 5—8 в водных (+ 25°) и спиртовых (+ 25 и —25°) растворах. Использованы две методики измерения эффективности переноса: по интегральным интенсивностям эмиссионных спектров и по скорректированным спектрам возбуждения. Полученные значения расстояний позволяют высказать предположение об участии в конформационном равновесии брадикинина конформеров со сближенными N- и C-концами.

Учитывая достижения последних лет в применении флуоресцентной спектроскопии к конформационному анализу пептидов и белков (см., например, [1—6]), мы предприняли в настоящей работе исследование спектров флуоресценции специально синтезированной серии аналогов пептидного гормона брадикинина.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
(I)	Arg	-Pro	-Pro	Gly	-Phe	-Ser	-Pro	-Phe	-Arg	
(II)	Dns	-Arg	-Pro	-Pro	-Gly	-Phe	-Gly	-Pro	-Tyr	-Arg
									[Dns-Arg ¹ , Gly ⁵ , Tyr ⁸]-брадикинин	
(III)	Dns	-Arg	-Pro	-Pro	-Gly	-Tyr	-Gly	-Pro	-Phe	-Arg
									[Dns-Arg ¹ , Tyr ⁵ , Gly ⁶]-брадикинин	
(IV)									Phe-Gly-Pro-Tyr-Arg	
(V)									Pro-Pro-Gly-Phe-Gly-Pro-Tyr-Arg	
(VI)									Arg-Pro-Pro-Gly-Phe-Gly-Pro-Tyr-Arg	
									[Gly ⁶ , Tyr ⁸]-брадикинин	
(VII)									Pro-Pro-Gly-Tyr-Gly-Pro-Phe-Arg	
(VIII)									Arg-Pro-Pro-Gly-Tyr-Gly-Pro-Phe-Arg	
									[Tyr ⁵ , Gly ⁶]-брадикинин	
(IX)									Trp-Gly-Pro-Phe-Arg	

* Настоящий адрес: Москва, Институт биологической и медицинской химии АМН СССР.

** Настоящий адрес: ГДР, Йена, Университет им. Фридриха Шиллера, отделение биохимии.



Флуоресцентный метод позволяет определять средние расстояния между хромофорными метками, введенными в различные участки молекулы, по эффективности безызлучательного переноса энергии между хромофорами [7, 8]. Согласно теории резонансного переноса Ферстера [8, 9], безызлучательный перенос энергии возбуждения от донорного хромофора к акцепторному может наблюдаться при условии перекрывания полосы флуоресценции донора с полосой поглощения акцептора, достаточного квантового выхода донора и расстояния между хромофорами не более $\sim 100 \text{ \AA}$. При выполнении этих условий расстояние между донором и акцептором (R_x) может быть найдено из уравнения Ферстера:

$$R_x = \sqrt[6]{\frac{R_0^6}{T} - R_0^6}, \quad (1)$$

где T — эффективность переноса, определяемая из спектров флуоресценции исследуемого соединения; R_0 — расстояние между хромофорами при 50% эффективности переноса (стандартная для данной хромофорной пары величина, определяемая из спектров флуоресценции модельных соединений).

Перенос может наблюдаться между двумя одинаковыми хромофорами (гомоперенос) или между разными хромофорами, один из которых является донором энергии, а другой — акцептором (гетероперенос). Эффективность гомопереноса определяется по уменьшению степени поляризации флуоресценции при наличии переноса энергии по сравнению со степенью поляризации хромофора в отсутствие переноса [10]. В молекуле природного брадикинина (I) имеются два остатка Phe, расстояние между которыми в принципе может быть определено этим методом. Однако невысокие значения квантового выхода остатков Phe делают такое определение затруднительным. Кроме того, надежное определение R_x достигается при условии $R_0/2 < R_x < 2R_0$ [7], тогда как ожидаемое значение этого параметра при $R_0 = 6 \text{ \AA}$ для пары Phe — Phe составляет 12—16 \AA , т. е. оно находится вне указанного интервала.

Более приемлемым представляется определение расстояний между разными хромофорами, в том числе специально введенными в молекулу брадикинина, по увеличению интенсивности флуоресценции акцептора за счет переноса энергии от донора [7]. С этой целью нами были измерены расстояния между хромофорами в хромофорных парах Tyr — Dns, Phe — Tyr, Phe — Trp и Tyr — Trp, расположенных по цепи брадикинина в следующих комбинациях: Dns¹ — Tyr⁸, Dns¹ — Tyr⁵, Phe⁵ — Tyr⁸, Tyr⁵ — Phe⁸, Trp⁵ — Tyr⁸ (соединения (II), (III), (VI), (VIII) и (XII) соответственно). Кроме того, определены расстояния в ряду укороченных аналогов (IV, V, VII, IX — XI). В соединениях (II) — (IX) произведена замена остатка Ser⁶ на -Gly⁶-, которая не приводит к изменениям биологической активности [11] и конформационных свойств [12] молекулы брадикинина. Вообще говоря, искусственная модификация природного пептида может приводить к смещению конформационного равновесия, однако опасность такого явления в ряду исследованных нами производных брадикинина, по видимому, невелика, как показало исследование кривых КД Tyr-содержащих аналогов (VI) и (VIII) [12]. Об этом же свидетельствует слабая зависимость полученных результатов от места замены Phe → X и природы остатка X (Phe, Tyr или Trp) (см. ниже). Еще одним доводом в пользу сохранения конформационного равновесия при произведенных заменах является

Таблица 1

Коэффициент молярной экстинкции акцептора (ϵ_A) и интенсивность флуоресценции донора (F_D) в области длин волн перекрывания, измеренные из спектров Ac-Tyr-NHMe и Ac-Phe-NHMe и использованные для расчета интеграла перекрывания хромофорной пары Phe - Tyr в H₂O ($I = 3,3 \cdot 10^{-13}$ см⁶·моль⁻¹) и в EtOH ($I = 4,1 \cdot 10^{-13}$ см⁶·моль⁻¹) *

λ , нм	ϵ_A , см ² ·моль ⁻¹		F_D		λ , нм	ϵ_A , см ² ·моль ⁻¹		F_D	
	H ₂ O	EtOH	H ₂ O	EtOH		H ₂ O	EtOH	H ₂ O	EtOH
260	557	469	0	0	295	15	62	61,7	58,4
265	858	758	5,83	3,4	300	10	16	46,5	33,9
270	1159	1132	41,1	33,9	305	7	10	30,9	23,9
275	1397	1441	82,7	79,0	310	5	7	21,2	14,7
280	1196	1515	100,0	99,7	315	0	1	13,3	8,1
285	798	1293	94,7	100,0	320	0	0	8,8	4,7
290	141	539	82,1	82,7	325	0	0	5,5	3,0

* $\bar{\lambda} = 280$ нм (H₂O) и 281 нм (EtOH).

Таблица 2

Интегралы перекрывания (I), квантовые выходы доноров (Q донора) и расстояния 50% эффективности переноса (R_0) хромофорных пар в соединениях (II) - (XII)

Хромофорная пара	I , см ⁶ ·моль ⁻¹		Q донора		R_0 , Å	
	H ₂ O	EtOH	H ₂ O	EtOH	H ₂ O	EtOH
Tyr - Dns	$2,3 \cdot 10^{-12}$	$2,4 \cdot 10^{-12}$	0,13	0,15	19,9	20,2
Phe - Tyr	$3,3 \cdot 10^{-13}$	$4,1 \cdot 10^{-13}$	0,05	0,04	12,1	11,8
Phe - Trp	$1,2 \cdot 10^{-12}$	$1,4 \cdot 10^{-12}$	0,05	0,04	15,0	14,4
Tyr - Trp	$4,2 \cdot 10^{-13}$	$3,3 \cdot 10^{-13}$	0,13	0,15	15,0	14,6

Примечание. При расчете R_0 использовано значение показателя преломления n 1,33 для водных растворов и n 1,36 для спиртовых растворов. В литературе приводятся следующие значения R_0 для водных растворов: Tyr - Dns 20,0 [30]; Phe - Tyr 12,0 [30, 31], 12,7 [19]; Phe - Trp 16,0 [31, 32], 16,8 [19]; Tyr - Trp 15,0 [31, 32], 14,7 [33].

прекрасная корреляция между расстояниями, измеренными в спин-меченых [13] и флуоресцентных аналогах брадикинина.

Как следует из уравнения (1), для расчета R_0 необходимо знать R_0 и T . Значения R_0 для использованных нами хромофорных пар определены из спектров модельных соединений (Ac-Tyr-NHMe, Boc-Pro-Tyr-Arg-OH, Ac-Phe-NHMe, Ac-Trp-NH₂, Boc-Pro-Phe-Arg-OH, Dns-Leu- и Dns-Phe) в воде и этаноле по уравнению

$$R_0 = \sqrt[6]{\frac{9000 \ln 10 K^2 Q}{128 \pi^3 n^4 N} I}, \quad (2)$$

где Q — квантовый выход донора; n — показатель преломления среды; N — число Авогадро; K^2 — коэффициент, учитывающий взаимную ориентацию донора и акцептора; I — интеграл перекрывания полосы флуоресценции донора и полосы поглощения акцептора.

Интеграл перекрывания рассчитывался по формуле

$$I = \int_0^{\infty} F_D^{\lambda} \epsilon_A^{\lambda} \bar{\lambda}^4 d\lambda \bigg/ \int_0^{\infty} F_D^{\lambda} d\lambda, \quad (3)$$

где F_D^{λ} — нормированная флуоресценция донора (условие нормировки: $\int_0^{\infty} F_D^{\lambda} d\lambda = 1$); ϵ_A^{λ} — молярная экстинкция акцептора; $\bar{\lambda}$ — среднее зна-

чение длин волн, отвечающих максимумам поглощения акцептора и флуоресценции донора.

В табл. 1 в качестве примера приведены данные, использованные для определения I хромофорной пары Phe—Tyr.

Значения входящего в уравнение (2) фактора ориентации K^2 могут находиться в пределах от 0 (при перпендикулярной ориентации переходных моментов донора и акцептора) до 4 (при параллельной ориентации). При беспорядочной ориентации $K^2 = 2/3$ [7]. Как правило, в расчетах используют именно это значение, если нет данных, свидетельствующих о заторможенном вращении метки. Мы также использовали значение $K^2 = 2/3$. Возможная неточность в определении расстояний, вносимая этим допущением, сравнительно невелика и даже для значений K^2 в пределах 0,1—3,9 составляет максимально 25—30%. Если же метки в молекуле обладают некоторой свободой вращения, то неопределенность становится еще меньше. Для остатков Phe, Tyr или Trp о свободе вращения качественно говорит весьма низкая степень поляризации флуоресценции (P) соответствующих аналогов (1—3% в воде, как и для свободных аминокислот). Кроме того, данные ЭПР [14] согласуются с предположением о свободном вращении спиновой метки, присоединенной к ОН-группе остатков серина или тирозина в производных брадикинина.

Для производных с объемной гидрофобной Dns-меткой имеются лишь более косвенные данные в пользу выбранных нами значений $K^2 = 2/3$. Прежде всего для водных растворов $\lambda_{\text{макс}}$ флуоресценции хромофора в соединениях (II) и (III) (550 нм) практически совпадают с $\lambda_{\text{макс}}$ модельных Dns-аминокислот (551 нм), указывая на отсутствие взаимодействия этой метки с гидрофобными участками молекулы брадикинина (положение максимума флуоресценции Dns-хромофора весьма чувствительно к полярности окружения [15]). Время жизни возбужденного состояния для Dns-Leu (8,1 нс) и для соединений (II), (III) (8,3 нс) в воде также практически совпадают. Время вращательной релаксации (ρ_h) Dns-производных брадикинина ($\rho_h = 3,9$ нс) лишь вдвое превышало соответствующие значения для Dns-Leu и Dns-Phe ($\rho_h = 1,9$ нс), тогда как при фиксированной метке можно было ожидать по крайней мере трехкратного различия во времени вращательной релаксации. Аналогичный вывод был сделан в работе [16] из сравнения времени вращательной релаксации дансильного хромофора в Dns-(Pro)₁₀-NHNH₂ и в Dns-Pro-NHNH₂, которые различались в 1,8 раза. Таким образом, по-видимому, Dns-метка обладает некоторым ограничением в свободе вращения. Но поскольку второй хромофор в исследуемых парах обладает свободным вращением, то выбор значения $K^2 = 2/3$ достаточно корректен [17].

Результаты расчетов R_0 для изученных хромофорных пар приведены в табл. 2. Эффективность переноса T из уравнения (1) определяется по увеличению интенсивности флуоресценции акцептора при наличии в молекуле донорного хромофора:

$$T = F_A^{\lambda_D} \varepsilon_A^{\lambda_A} / F_A^{\lambda_A} \varepsilon_D^{\lambda_D}, \quad (4)$$

где $F_A^{\lambda_A}$ и $F_A^{\lambda_D}$ — интегральные интенсивности полосы флуоресценции акцептора при длине волны возбуждения акцептора λ_A (в отсутствие переноса энергии от донора) и при длине волны возбуждения донора λ_D (при наличии переноса); $\varepsilon_A^{\lambda_A}$ и $\varepsilon_D^{\lambda_D}$ — молярные коэффициенты экстинкции акцептора при λ_A и донора при λ_D соответственно.

Важным моментом в расчете T является контроль за аддитивностью оптических плотностей донорного и акцепторного хромофора в исследованных соединениях (II) — (XII). Соответствующие значения молярных экстинкций донора и акцептора получены из УФ-спектров пересчисленных выше модельных соединений.

Возможны два способа определения T : из эмиссионных спектров и из скорректированных спектров возбуждения. В первом случае измеряется увеличение интегральной интенсивности спектра испускания акцептора при возбуждении в полосе поглощения донора по сравнению с интенсивностью флуоресценции акцептора при той длине волны возбуждения, где нет поглощения донора (при прямом возбуждении акцептора). Практически часто бывает (и это наблюдалось для всех исследованных нами хромофорных пар), что полосы поглощения донора и акцептора перекрываются во всем диапазоне длин волн возбуждения. Тогда при расчете T необходимо учитывать и прямое возбуждение акцептора при λ_D . При измерении достаточно концентрированных растворов приходится также специально учитывать эффект самопоглощения света (так называемый эффект внутреннего фильтра), однако в нашем случае в этом нет необходимости, поскольку исследованные нами растворы имели значения оптической плотности в полосе возбуждения не более 0,06 (см. «Экспериментальную часть»).

Формула, учитывающая прямое возбуждение акцептора при λ_D , приводится Шиллером [5]:

$$T = (F_A^{\lambda_D} - F_A^{0\lambda_D}) \varepsilon_A^{\lambda_D} / F_A^{0\lambda_D} \varepsilon_D^{\lambda_D}, \quad (5)$$

где $F_A^{0\lambda_D}$ — интенсивность флуоресценции акцептора в отсутствие донора при λ_D .

Из уравнения (5) следует, что кроме интенсивности флуоресценции исследуемого соединения необходимо измерять интенсивность флуоресценции при λ_D модельного соединения, содержащего только акцепторный хромофор. При этом для корректного применения формулы (5) необходимо, чтобы квантовые выходы исследуемого и модельного соединения совпадали, что не всегда имеет место (см., например, [17, 18]).

В настоящей работе была использована выведенная нами формула

$$T = \varepsilon_A^{\lambda_A} (F_A^{\lambda_D} K_{\lambda} - F_A^{\lambda_A} \varepsilon_A^{\lambda_D} / \varepsilon_A^{\lambda_A}) / \varepsilon_D^{\lambda_D} F_A^{\lambda_A}, \quad (6)$$

где K_{λ} — коэффициент светимости лампы при разных длинах волн возбуждения (определяется по соотношению интегральных интенсивностей 2-аминопиридина при длинах волн возбуждения λ_D и λ_A); $\varepsilon_A^{\lambda_D}$ — молярный коэффициент экстинкции акцептора при длине волны возбуждения донора.

Для применения формулы (6) требуется измерение интенсивности данного соединения при λ_D и λ_A , а значение интенсивности флуоресценции акцептора при λ_D в отсутствие донора получается пересчетом из $F_A^{\lambda_A}$ по соотношению экстинкций акцептора при λ_D и λ_A . В этом случае модельное соединение нужно только для определения $\varepsilon_A^{\lambda_D}$, а не интенсивности флуоресценции $F_A^{0\lambda_D}$, которая в разных соединениях может довольно сильно различаться.

Определение R_x из скорректированных спектров возбуждения — методически более простая процедура, поскольку определяются пиковые, а не интегральные интенсивности и не требуется учитывать коэффициент светимости лампы. Если спектры флуоресценции брадикинина и соответствующего модельного акцепторного соединения построить в шкале экстинкций, расчетная формула (4) для этого случая приобретает более простой вид [19]:

$$T = \Delta F_A^{\lambda_D} / \varepsilon_D^{\lambda_D}, \quad (7)$$

где $\Delta F_A^{\lambda_D}$ — прирост интенсивности флуоресценции акцептора при λ_D по сравнению с флуоресценцией акцептора при λ_A .

Таблица 3

Эффективность переноса (Т) в соединениях (IV)–(IX), измеренная из интенсивностей эмиссионных спектров*

Соединение	Растворитель	$\epsilon_{D}^{\lambda_D}$	$\epsilon_{A}^{\lambda_D}$	$\epsilon_{A}^{\lambda_A}$	$F_{A}^{\lambda_D}$	Т
		см ² ·моль ⁻¹			%	
(IV)	H ₂ O	194	560	1200	34,44	33
	EtOH	230	470	1500	21,87	11
(V)	H ₂ O	194	560	1200	36,36	51
	EtOH	230	470	1500	26,23	54
(VII)	H ₂ O	194	560	1200	34,01	29
	EtOH	230	470	1500	25,12	43
(VIII)	H ₂ O	194	560	1200	33,90	28
	EtOH	230	470	1500	24,20	34
(IX)	H ₂ O	194	3040	4270	47,99	28
	EtOH	230	2650	4430	42,61	87

* $F_{A}^{\lambda_A}$ во всех случаях 100%; $K_D = 1,51$; λ_D 260 нм и λ_A 280 нм.

Таблица 4

Эффективность переноса (Т) в соединениях (II)–(XII), измеренная из скорректированных спектров возбуждения

Соединение	Растворитель	λ_D	λ_A	$\epsilon_{D}^{\lambda_D}$	$\epsilon_{A}^{\lambda_A}$	$\Delta F_{A}^{\lambda_D}$	Т, %
		нм		см ² ·моль ⁻¹			
(II)	H ₂ O	280	330	1200	4100	1160	97
	EtOH			1500	4400	1450	97
(III)	H ₂ O	280	330	1200	4100	980	82
	EtOH			1500	4400	1440	96
(IV)	H ₂ O	260	280	194	1200	70	35
	EtOH			230	1500	45	20
(V)	H ₂ O	260	280	194	1200	85	43
	EtOH			230	1500	90	40
(VII)	H ₂ O	260	280	194	1200	95	48
	EtOH			230	1500	90	40
(VIII)	H ₂ O	260	280	194	1200	60	32
	EtOH			230	1500	100	42
(IX)	H ₂ O	260	280	194	4270	120	60
	EtOH			230	4430	140	60
(X)	H ₂ O	280	300	1200	790	880	73
	EtOH			1500	1030	1260	84
(XI)	H ₂ O	280	300	1200	790	670	56
	EtOH			1500	1030	960	64
(XII)	H ₂ O	280	300	1200	790	470	39
	EtOH			1500	1030	480	52

Метод определения Т по интегральным интенсивностям эмиссионных спектров, по-видимому, дает более точные результаты и использован нами для соединений (IV), (V), (VIII) (см. табл. 3) с хромофорной парой Phe — Tug, для которой точность определения R_x существенно ниже, чем для пар Tug — Trp или Tug — Dns, из-за невысокого квантового выхода донора Phe (0,04–0,05). Примеры определения Т по скорректированным спектрам возбуждения для всех типов хромофорных пар даны на рис. 1–4, а результаты расчетов по соединениям (II) — (XII) сведены в табл. 4.

Таблица 5

Эффективность переноса T и средние расстояния R_x (Å) между хромофорами соединений (II) – (XII) хромофорные пары подчеркнуты; параметры, полученные: а – из эмиссионных спектров, б – из корректированных спектров возбуждения

Соединение	H ₂ O, +23°						EtOH, +25°						EtOH, -25°	
	T			R _x			T			R _x			T	R _x
	a	б	а	б	а	б	a	б	а	б	а	б	а	б
(II) Dns-Arg-Pro-Pro ¹ Gly-Phe-Gly-Pro-Tyr-Arg ⁹	-	0,97	-	11,1	-	0,97	-	11,1	-	0,97	-	11,1	0,97	11,1
(III) Dns-Arg-Pro-Pro-Gly-Tyr-Gly-Pro-Phe-Arg	-	0,82	-	15,5	-	0,96	-	15,5	-	0,97	-	11,6	0,97	11,6
(IV) Phe-Gly-Pro-Tyr-Arg	0,35	0,33	13,4	13,6	0,20	0,11	14,9	16,7	-	-	-	-	-	-
(V) Pro-Pro-Gly-Phe-Gly-Pro-Tyr-Arg	0,43	0,51	12,7	12,0	0,40	0,54	12,6	11,5	-	-	-	-	-	-
(VI) Arg-Pro-Pro-Gly-Phe-Gly-Pro-Tyr-Arg	0,36	0,29	13,3	14,1	-	0,36	-	13,6	-	0,49	-	11,9	-	-
(VII) Pro-Pro-Gly-Tyr-Gly-Pro-Phe-Arg	0,48	0,29	12,3	14,0	0,40	0,43	12,6	12,4	-	-	-	-	-	-
(VIII) Arg-Pro-Pro-Gly-Tyr-Gly-Pro-Phe-Arg	0,32	0,28	13,7	14,2	0,42	0,39	12,4	12,8	-	-	-	-	0,57	11,3
(IX) Trp-Gly-Pro-Phe-Arg	0,60	0,28	14,0	17,5	0,60	0,87	11,0	10,5	-	-	-	-	-	-
(X) Boc-Trp-Ser-Pro-Tyr-Arg	-	0,73	-	12,7	-	0,87	-	11,1	-	-	-	-	-	-
(XI) Pro-Pro-Gly-Trp-Ser-Pro-Tyr-Arg	-	0,56	-	14,4	-	0,64	-	13,3	-	0,72	-	12,6	-	-
(XII) Arg-Pro-Pro-Gly-Trp-Ser-Pro-Tyr-Arg	-	0,39	-	16,1	-	0,52	-	14,4	-	-	-	-	-	-

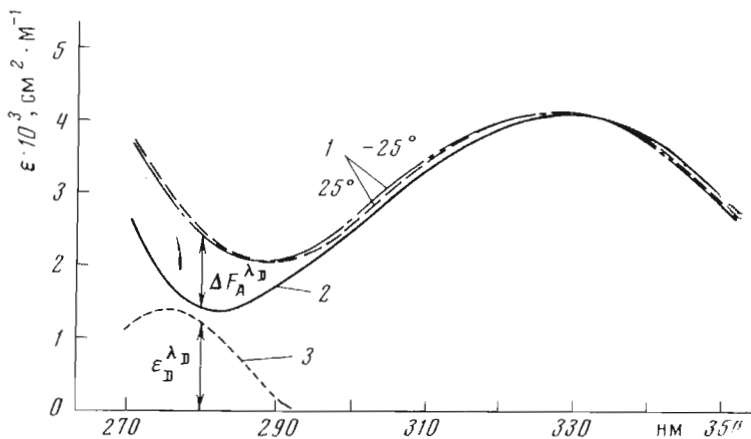


Рис. 1. Определение эффективности переноса Т от Туг к Dns для Dns-Arg-Pro-Pro-Gly-Tyr-Gly-Pro-Phe-Arg (III) в EtOH по скорректированным спектрам возбуждения ($\lambda_{эм}$ 550 нм). Спектры возбуждения для соединения (III) (1) и Dns-Leu (2) и спектр поглощения Ac-Tyr-NHMe (3) приведены в шкале молярных экстинкций

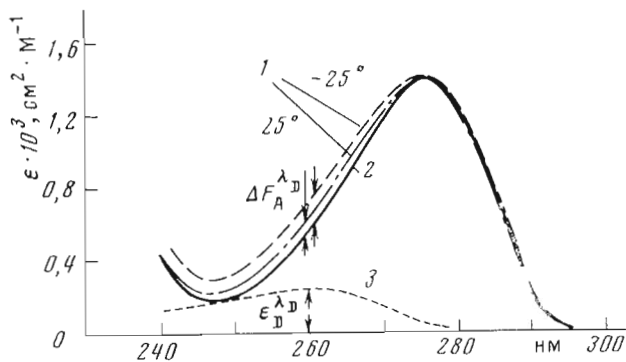


Рис. 2. Определение эффективности переноса Т от Phe к Туг для Arg-Pro-Gly-Phe-Gly-Pro-Tyr-Arg (VI) в EtOH по скорректированным спектрам возбуждения ($\lambda_{эм}$ 320 нм). Спектры возбуждения соединения (VI) (1) и Ac-Tyr-NHMe (2), а также спектр поглощения Boc-Pro-Phe-Arg (3) приведены в шкале молярных экстинкций

В итоговой табл. 5 даны окончательные результаты определения Т и R_x по двум методикам. Экспериментальные параметры Т, R_0 , Q, I, а следовательно, и R_x определены с точностью 10—15%, типичной для такого рода измерений [20]. Как видно из таблицы, наибольшее число данных получено для аналогов с ароматическими остатками, расположенными в положениях 5 и 8. Сопоставление значений R_x для пар соединений (V) — (VII) и (VI) — (VIII) показывает, что они слабо зависят от места замены Phe → Tyr (5 или 8). Сходные результаты получаются и при переходе от донорно-акцепторной пары Phe — Tyr к паре Tyr — Trp, как видно из сопоставления значений R_x для соединений (VII) и (XI), а также (VI) и (XII). Несколько большие расстояния для второй пары объясняются большими размерами индолильного радикала триптофана по сравнению с фенильным радикалом фенилаланина. Из изложенного следует, что в исследованном ряду соединений конформационные состояния пептидов слабо зависят от природы ароматических остатков, т. е. полученные для аналогов (VI), (VIII) и (XII) данные могут быть распространены и на природный гормон.

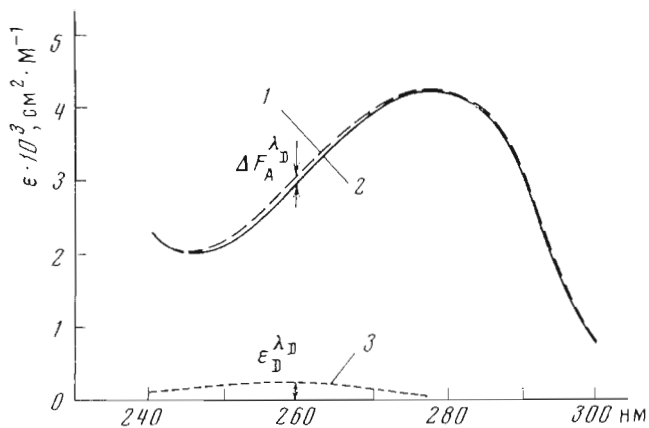


Рис. 3. Определение эффективности переноса Т от Phe к Trp для Trp-Gly-Pro-Phe-Arg (IX) в EtOH по скорректированным спектрам возбуждения ($\lambda_{эм} \ 350 \text{ нм}$). Спектры возбуждения соединения (IX) (1) и Ac-Trp-NH₂ (2), а также спектр поглощения Ac-Phe-NHMe (3) приведены в шкале молярных экстинкций

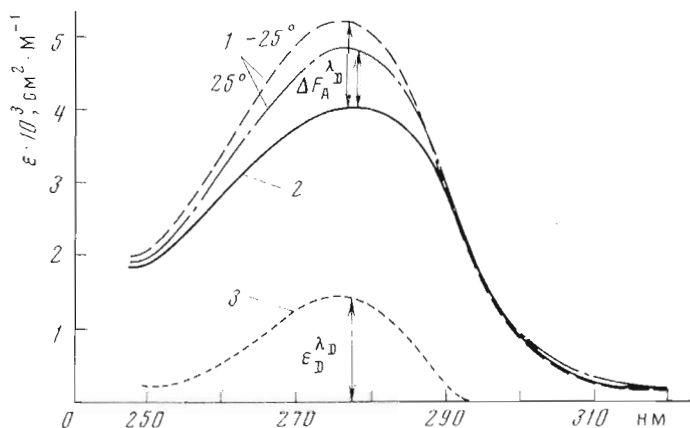


Рис. 4. Определение эффективности переноса Т от Tyr к Trp для Pro-Gly-Trp-Ser-Pro-Tyr-Arg (XI) в EtOH по скорректированным спектрам возбуждения ($\lambda_{эм} \ 360 \text{ нм}$). Спектры возбуждения соединения (XI) (1) и Ac-Trp-NH₂ (2), а также спектр поглощения Boc-Pro-Tyr-Arg (3) приведены в шкале молярных экстинкций

Обращает на себя внимание, что у ближайших аналогов брадикинина — (VI) и (VIII) — наблюдается тенденция к уменьшению расстояний между боковыми цепями пятого и восьмого остатков ($R_{\chi^{5,8}}$) в этаноле при понижении температуры от $+25$ до -25° . Этот результат коррелирует с увеличением интенсивности положительных эффектов Котона при 220 нм, при аналогичной смене условий для брадикинина и его [Gly⁶]-аналога [12]. Не исключено, что оба рассматриваемых явления объясняются стабилизацией при пониженных температурах и дестабилизацией при нагревании предсказанного теоретически [21] гидрофобного кластера, образованного двумя фенильными группами остатков Phe⁵ и Phe⁸ и пирролидиновым циклом остатка Pro⁷:



Фенильные группы в этой структуре пространственно сближены, что приводит к эффективному переносу энергии, а остатки Phe⁵, Ser⁶ и Phe⁸ принимают В-конформацию, характеризующуюся положительными значениями эффектов Коттона при ~220 нм (см. [12] и приведенные там ссылки). Причины систематического (кроме соединения (IV)) уменьшения значений R_x^{5,8} при переходе от воды к этанолу остаются неясными.

Можно также отметить, что расстояния R_x^{5,8} меняются в интервале 12—15 Å для пары Phe—Tyr и в интервале 11—16 Å для пары Tyr—Trp в зависимости от природы N-концевого фрагмента, связанного с C-концевым тетрапептидом. Например, значения R_x^{5,8} увеличиваются на 1—2 Å при добавлении к октапептидам (V) или (XI) остатка Arg¹, отделенного от участка 5—8 тремя аминокислотными остатками, т. е. при переходе к нонапептидам (VI) и (XII). Указанный факт естественно объяснить взаимодействием C- и N-концевых участков брадикинина; природа этих взаимодействий будет рассмотрена в последующих работах настоящей серии.

К аналогичному заключению приводит анализ данных по соединениям (II) и (III). Как видно из табл. 5, значения R_x^{1,5} равны (в этаноле) или даже превышают (в воде) значения R_x^{1,8}, что позволяет исключить из рассмотрения неупорядоченные или «вытянутые» конформации брадикинина, для которых должно было бы наблюдаться постепенное увеличение R_x по мере удаления донора и акцептора флуоресценции вдоль цепи. Таким образом, спектры флуоресценции флуоресцентно меченных аналогов брадикинина указывают на участие в конформационном равновесии специфических конформеров со сближенными N- и C-концами; в последующих сообщениях этот вывод будет развит и детализован.

Экспериментальная часть

Модельные соединения Ac-Tyr-NHMe, Ac-Phe-NHMe и Ac-Trp-NH₂ были синтезированы по методике, приведенной в работе [22], соединения Boc-Pro-Phe-Arg-OH и Boc-Pro-Tyr-Arg-OH — по методикам, описанным в работах [23] и [24] соответственно. Дансильные производные лейцина и фенилаланина — препараты фирмы Reanal (Венгрия). Соединения (IV), (V) и (XI) представляли собой хлористоводородные соли, соединения (VI), (VIII) и (XII) — ацетаты, а соединение (IX) — свободное основание. Соединения (I) — (VIII) охарактеризованы ранее [24], синтез соединений (IX) — (XII) будет описан в последующих сообщениях. Для приготовления водных растворов использовали бидистиллат. Концентрации растворов при съемке спектров флуоресценции составили (2—5)·10⁻⁵ моль/л, толщина кювет 1 см, значения оптических плотностей в диапазоне длин волн возбуждения не превышали 0,06 [25]. Спектры флуоресценции и скорректированные спектры возбуждения получены на приборе MPF-3 (Hitachi, Япония). Значения степени поляризации флуоресценции (P) рассчитывались по формуле

$$P = \frac{F_{\parallel} - F_{\perp}}{F_{\parallel} + F_{\perp}}, \quad (8)$$

где F_∥ и F_⊥ — интенсивности флуоресценции при параллельном и перпендикулярном расположении поляризаторов (соответственно). Значения времени вращательной релаксации (ρ_h) рассчитаны по уравнению Перрена — Вебера [26]:

$$\frac{1}{P} - \frac{1}{3} = \left(\frac{1}{P_0} - \frac{1}{3} \right) \left(1 + \frac{3\tau}{\rho_h} \right), \quad (9)$$

где P — экспериментально наблюдаемая степень поляризации флуоресценции; P₀ — предельная поляризация в отсутствие броуновского движения, полученная экстраполяцией значений степени поляризации соеди-

нений Dns-Leu и (II) в водно-глицериновых смесях к бесконечной вязкости [27]; τ — время жизни возбужденного состояния метки.

Время жизни возбужденного состояния измерено на фазовом флуориметре [28].

Коррекция спектров флуоресценции и оценка величины квантового выхода проводилась с помощью стандартов: α -аминопиридина ($Q = 0,6$; $\lambda_{\text{макс}} 367$ нм) [29] и сульфата хирина ($Q = 0,46$; $\lambda_{\text{макс}} 460$ нм) [29]. УФ-спектры сняты на спектрофотометре CARY-15 (Varian, США).

Авторы выражают благодарность А. Г. Ивановой, синтезировавшей модельные соединения Ас-Тур-NHMe, Ас-Phe-NHMe и Ас-Trp-NH₂.

ЛИТЕРАТУРА

1. Blumberg W. E., Dale R. E., Eisinger J., Zuckerman D. M. (1974) *Biopolymers*, 13 (8), 1607—1620.
2. Visser A. J. W. G., Grande H. J., Müller F., Veeger C. (1974) *Eur. J. Biochem.*, 45, 99—107.
3. Erand R. M., Wheeler G. E. (1975) *Biochim. et biophys. acta*, 393, 236—246.
4. Gennis L. S., Gennis R. B., Cantor C. R. (1972) *Biochemistry*, 11 (13), 2517—2524.
5. Schiller P. W. (1972) *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 69, 975—979.
6. Wu C.-W., Stryer L. (1972) *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 69, 1104—1108.
7. Steinberg I. Z. (1971) *Annu. Rev. Biochem.*, 40, 83—114; Dale R. E., Eisinger J. (1976) *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 73, 271—282.
8. Förster T. (1959) *Disc. Faraday Soc.*, 27, 7—23.
9. Förster T. (1966) in *Modern Quantum Chemistry* (Sinangly O., ed.), *Istanbul Lectures*, Part III, pp. 93—137, Acad. Press, N. Y.
10. Edelhoch H., Perlman R. L., Wilcheck M. (1968) *Biochemistry*, 7, 3893—3900.
11. Bodanszky M., Sheehan J. T., Ondetti M. A., Lande S. (1963) *J. Amer. Chem. Soc.*, 85, 991—997.
12. Иванов В. Т., Филатова М. П., Рейссманн З., Реутова Т. О., Чехляева Н. М. (1977) *Биоорган. химия*, 3, 1157—1168.
13. Филатова М. П., Рейссманн З., Реутова Т. О., Иванова В. Т., Григорян Г. Л., Шапиро А. М., Розанцев Э. Г. (1977) *Биоорган. химия*, 3, 1181—1189.
14. Filatova M. P., Reissman S., Ravdel G. A., Ivanov V. T., Grigoryan G. L., Shapiro A. B. (1973) in *Peptides — 1972* (Hanson H., Jakubke H.-D., eds.), North-Holland/American Elsevier, pp. 333—340, Amsterdam — New York.
15. Добрецов Г. Е., Владимиров Ю. А. (1975) *Успехи биол. химии*, т. XVI, с. 115—134, «Наука», М.
16. Stryer L., Haugland R. P. (1976) *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 58, 719—726.
17. Schiller P. W. (1975) in *Biochemical Fluorescence: Concepts* (Chen R., Edelhoch H., eds.), Marcel Dekker Inc., New York, pp. 285—303; Eisinger J. (1969) *Photochem. Photobiol.*, 9, 247—258.
18. Cowgill R. W. (1963) *Biochim. et biophys. acta*, 75, 272—273.
19. Eisinger J., Feuer B., Lamola A. A. (1969) *Biochemistry*, 8, 3908—3915.
20. Latt S. A., Cheung H. T., Blout E. R. (1965) *J. Amer. Chem. Soc.*, 87, 995—1003.
21. Галактионов С. Г., Шерман С. А., Шендерович М. Д., Никифорович Г. В., Леонова В. И. (1977) *Биоорган. химия*, 3, 1190—1197.
22. Костецкий П. В., Цетлин В. И., Иванов В. Т., Овчинников Ю. А. (1973) *Химия природн. соединен.*, 319—322.
23. Филатова М. П., Крит Н. А., Сучкова Г. С., Равдель Г. А., Иванов В. Т. (1975) *Биоорган. химия*, 1, 437—446.
24. Reissmann S., Filatova M. P., Reutova T. O., Arold H., Ivanov V. T. (1976) *J. prakt. chem.*, 318, 429—440.
25. Паркер С. (1972) *Фотолюминесценция растворов*, «Мир», М.
26. Weber G. (1952) *Biochem. J.*, 51, 145—154.
27. Johnson P., Thornton A. C. R. (1969) *Biochem. J.*, 115, 725—732.
28. Борисов А. Ю., Тумерман Л. А. (1959) *Изв. АН СССР. Сер. физ. н.*, 33, 97—98.
29. Rusakowicz R., Testa A. C. (1968) *J. Phys. Chem.*, 72, 2680—2681.
30. Stryer L. (1959) *Biochim. et biophys. acta*, 35, 242—244.
31. Karreman G., Steele R. H., Szentgyorgyi A. (1958) *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 44, 140—144.
32. Stryer L. (1960) *Radiat. Res. Suppl.*, 2, 432—436.
33. Perlman R. L., van Zyl A., Edelhoch H. (1968) *J. Amer. Chem. Soc.*, 90, 2168—2172.

Поступила в редакцию
21.III.1977

II. FLUORESCENCE SPECTRA

EFREMOV E. S., FILATOVA M. P., REUTOVA T. O.,
STEPANOVA L. N., REISSMANN Z., IVANOV V. T.

*M. M. Shemyakin Institute of Bioorganic Chemistry,
Academy of Sciences of the USSR, Moscow*

Fluorescence studies are presented of 11 fluorescence labelled bradykinin derivatives, the labels being introduced into positions 1 (Dns), 5 and 8 (Phe, Tyr, Trp) of the molecule. The interchromophoric distances 1—5, 1—8 and 5—8 were obtained from the radiationless energy transfer measurements in aqueous (+25°) and ethanolic solutions (25 and —25°). The transfer efficiencies were determined from the sensitized emission spectra and corrected excitation spectra. The distances obtained are indicative of a non-random, folded structure of the investigated peptides.
