

ANALYSE CONFORMATIONNELLE DE LA MET-ENCEPHALINE PAR ETUDE EN RMN <sup>13</sup>C  
DES TEMPS DE RELAXATION LONGITUDINALE T<sub>1</sub>.

S. COMBRISSE

Ecole de Physique et Chimie

10 rue Vauquelin, 75005 PARIS. France

B.P. ROQUES\* et R. OBERLIN

\*Département de Chimie Organique, ERA 613 (CNRS)

Université René Descartes, 4 avenue de l'Observatoire

75270 PARIS CEDEX 06. France

(Received in France 7 July 1976; received in UK for publication 9 August 1976)

La récente découverte dans des extraits de cerveau de deux pentapeptides, la Leu-encephaline et la Met-encephaline (1) qui pourraient jouer le rôle d'effecteurs endogènes du récepteur morphinique a provoqué un intérêt considérable (2) (3). Le plus actif de ces peptides, la Met-encephaline (H-Tyr-Gly-Gly-Phe-Met-OH) possède la plupart des propriétés pharmacologiques des morphiniques (4). Nous avons récemment montré par RMN <sup>1</sup>H à 300 MHz que la Met-encephaline possède en solution une conformation repliée dans laquelle le reste N-terminal Tyr-Gly joue le rôle de la région opioïde commune à toutes les structures rigides des opiacées (5) (6). La présence d'une conformation préférentielle étant relativement inattendue pour un pentapeptide, il était important de confirmer ce résultat par une étude en RMN <sup>13</sup>C des temps de relaxation longitudinale T<sub>1</sub> ce qui permet, dans certaines conditions, d'accéder aux mouvements généraux et locaux des peptides (7) (8).

Dans ce travail préliminaire nous avons interprété complètement le spectre <sup>13</sup>C de la Met-encephaline, déterminé tous les T<sub>1</sub> et calculé les différents temps de corrélation τ<sub>mol</sub> et τ<sub>int</sub>. La présence d'une conformation ou d'une famille de conformations repliées est discutée en termes d'interactions peptide-récepteur.

PARTIE EXPERIMENTALE Les spectres <sup>13</sup>C ont été obtenus sur un appareil VARIAN XL 100 fonctionnant à 25,2 MHz en mode FT. Les temps de relaxation T<sub>1</sub> ont été mesurés par la méthode d'inversion-retour 180°, τ, 90° (séquences de 10 valeurs de τ comprises entre 10 ms et 300 ms). Les valeurs de T<sub>1</sub> sont calculées par regression linéaire (0,95 < r < 0,99). Les T<sub>1</sub> des <sup>13</sup>CO et des carbones aromatiques quaternaires ont été mesurés par la méthode de saturation progressive et les valeurs obtenues sont relativement imprécises et ne fournissent qu'un ordre de grandeur des T<sub>1</sub>. Les déplacements chimiques δ sont exprimés par rapport au TMS en référence interne. La Met-encephaline a été synthétisée dans le laboratoire par une méthode en phase liquide ( ).

RESULTATS - DISCUSSION La figure I représente le spectre de la Met-encephaline en solution dans le DMSO d<sub>6</sub>/D<sub>2</sub>O, 50/50. Les déplacements chimiques δ des différents carbones (Tableau I) ont été obtenus à partir des résultats de la littérature (9) sauf pour les différents CO, CHα et CH<sub>2</sub>α. Ceux-ci ont été déduits des expériences de variation des δ en fonction du pH (10) (Figure II). La titration du résidu C-terminal (pH 4-5) permet d'attribuer les CO, CHα et CH<sub>2</sub>β de Met alors que l'élévation du pH (7 à 10) conduit à la déprotonation du NH<sub>3</sub><sup>+</sup> terminal et à l'attribution des signaux des CO, CHα et CH<sub>2</sub>β de Tyr. Pour ce résidu l'effet est plus important en β qu'en α comme cela a déjà été signalé (11). Le déblindage du Cζ de Tyr à pH 10 est dû à la déprotonation du groupe OH. La seule ambiguïté restante concerne les CO et les CH<sub>2</sub>α des glycines.

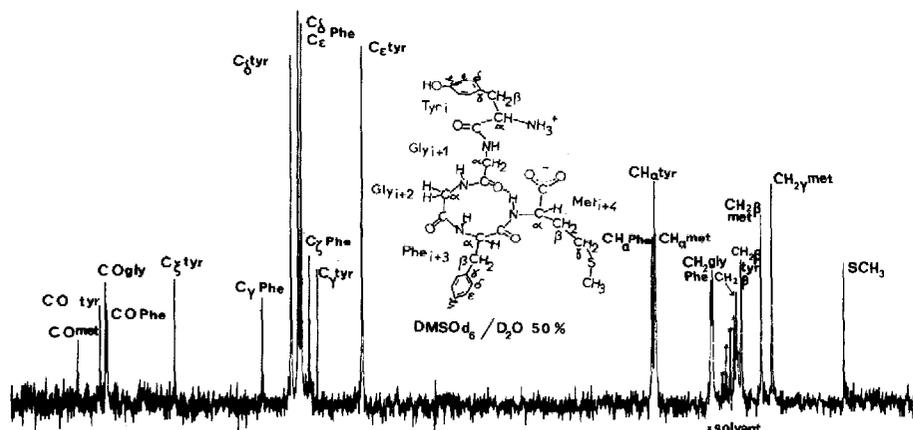


Figure I.

Spectre  $^{13}\text{C}$  de la Met-enkephaline (0,1 M dans  $\text{DMSO-d}_6/\text{D}_2\text{O}$ , 50/50, pH 6,8, temp.  $38^\circ\text{C}$ , 8000 impulsions, intervalles 1 s, angle d'impulsion  $90^\circ$ ). La Met-enkephaline est représentée schématiquement dans le conformation proposée par RMN  $^1\text{H}$  (6).

EFFET OVERHAUSER (NOE) ET TEMPS DE RELAXATION  $T_1$

Tous les  $^{13}\text{C}$  protonés ont un NOE max (200 %) et leur mécanisme de relaxation est donc uniquement de type dipôle-dipôle. Nous limiterons la discussion aux  $^{13}\text{C}$  protonés. Les valeurs de  $T_1$  des différents carbones sont rassemblées dans le tableau I et données en  $\text{NT}_1$  (N = nombre de protons liés au C).

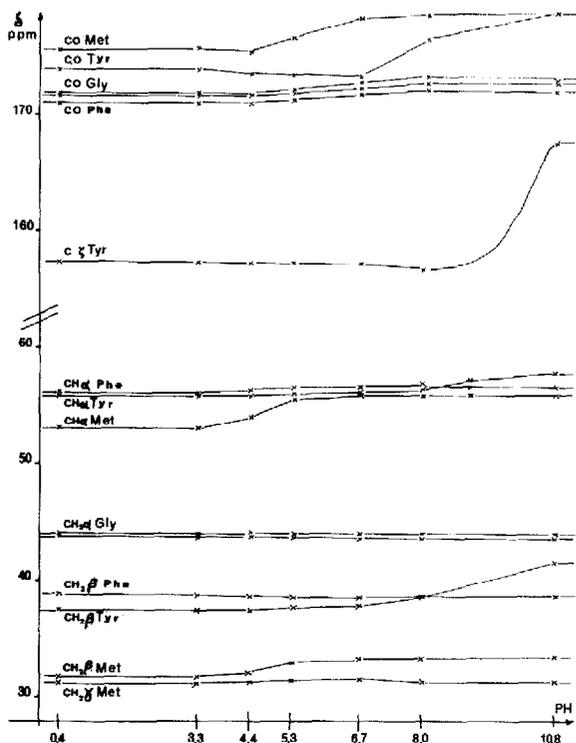


Figure II.

Variation des  $\delta^{13}\text{C}$  de la Met-enkephaline en fonction du pH (0,1 M dans  $\text{DMSO-d}_6/\text{D}_2\text{O}$ ). Les valeurs de pH sont celles données par le pH-mètre et n'ont pas été corrigées.

AA	$^{13}\text{C}$	$\delta/\text{TMS}$	$\text{NT}_1$
Tyr	$\text{CH}_\alpha$	55,3	172 ms
	$\text{CH}_2\beta$	37,3	192 ms
	$\text{C}_\gamma$	126,4	1,7 s
	$\text{CH}_\delta$	131,6	180 ms
	$\text{CH}_\epsilon$	130,1	164 ms
	$\text{C}_\zeta$	156,5	4 s
	$\text{C}=\text{O}$	172,0	1,5 s
Gly *	$\text{CH}_2\alpha$	43,3	208 ms
	$\text{C}=\text{O}$	171,3	1,5 s
Gly *	$\text{CH}_2\alpha$	42,9	226 ms
	$\text{C}=\text{O}$	171,0	2,6 s
Phe	$\text{CH}_\alpha$	55,7	151 ms
	$\text{CH}_2\beta$	37,9	206 ms
	$\text{C}_\gamma$	137,9	2 s
	$\text{CH}_\delta$	129,5	247 ms
	$\text{CH}_\epsilon$	130,1	246 ms
	$\text{CH}_\zeta$	127,8	151 ms
Met	$\text{C}=\text{O}$	170,8	2,2 s
	$\text{CH}_\alpha$	55,0	167 ms
	$\text{CH}_2\beta$	32,9	320 ms
	$\text{CH}_2\gamma$	30,5	462 ms
	$\text{SCH}_3$	15,4	1,3 s
	$\text{COO}^-$	176,6	1,5 s

\* Ces attributions peuvent être inversées.

TABLEAU I

Les points les plus importants à noter sont : a) La valeur moyenne des  $NT_1$  des  $CH\alpha$  du squelette ( $\sim 150$  ms) est de l'ordre de celles trouvées dans l'antibiotique cyclique Gramicidine S (140 ms) (12) et l'octapeptide linéaire angiotensine II ( $\sim 110$  ms) (8) ; b) Les  $NT_1$  des  $CH_2\alpha$  des glycines sont plus élevés et cette augmentation a été attribuée soit à une longueur de liaison C-H plus grande, soit à un degré de liberté plus important de ces  $^{13}C$  en raison de l'absence de substituant ; c) Les  $NT_1$  des  $CH\alpha$  des résidus terminaux (Tyr et Met) sont du même ordre ou même inférieurs aux  $CH_2\alpha$  Gly et  $CH\alpha$  Phe.

Ce dernier point est extrêmement important puisque lorsqu'il existe un ensemble de conformations moyennées dans des peptides linéaires tels que LH-RH (11) ou Gly-Gly-X-Gly-Gly (13) ou dans le reste linéaire d'un peptide cyclique (14), on observe des  $NT_1$  3 à 4 fois plus grands pour les  $CH\alpha$  des restes terminaux que pour les  $CH\alpha$  des résidus centraux. Par contre dans le cas d'une conformation repliée (angiotensine) ou cyclique (ocytocine) les  $NT_1$  des  $CH\alpha$  sont du même ordre dans l'ensemble de la molécule.

Tous ces résultats sont donc en faveur d'une conformation repliée pour la Met-encephaline. La structure de la molécule serait dans ces conditions à peu près sphérique et donc son mouvement de réorientation isotrope. D'autre part les conditions expérimentales (conc, temp.) et les valeurs de  $T_1$  indiquent que les conditions du retrécissement extrême sont remplies. Nous pouvons donc relier les  $T_1$  aux temps de corrélation de réorientation moléculaire  $\tau_{mol}$ . Toutefois s'il existe des possibilités de mouvements de réorientation locaux (rotation, oscillations autour des liaisons etc...) à une vitesse  $1/\tau_{int} > 1/\tau_{mol}$ , le temps de corrélation effectif  $\tau_{eff}$  sera une combinaison de  $\tau_{mol}$  et  $\tau_{int}$  selon [1].

$$* \quad 1/NT_1 = \hbar^2 \gamma_C^2 \gamma_H^2 r^{-6} \tau_{mol} [A + B \frac{6\tau_{int}}{6\tau_{mol}} + C \frac{3\tau_{int}}{3\tau_{int} + \tau_{mol}}] \quad \text{avec } A = 1/4(3\cos^2\theta - 1)^2 \quad [1]$$

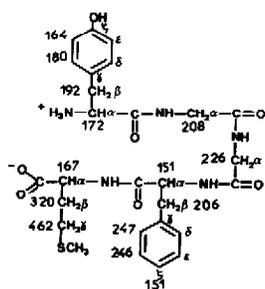
$$B = 3\sin^2\theta \cos^2\theta$$

$$C = 3/4\sin^4\theta$$

En l'absence de mouvement interne  $\tau_{mol} = \tau_{int}$  et tous les  $NT_1$  sont pratiquement égaux. En cas de réorientation locale  $\tau_{mol} > \tau_{int}$  et les valeurs de  $NT_1$  varient d'un carbone à l'autre. D'une façon générale, plus les valeurs de  $T_1$  sont grandes plus la possibilité de mouvement interne sur le  $^{13}C$  considéré est grande et donc le degré de liberté important. La constante des  $NT_1$  des  $CH\alpha$  et  $CH_2\alpha$  de la Met-encephaline indique une absence de mouvement segmental du squelette. Le temps de corrélation de l'ensemble de la molécule calculé à partir de [1] est :  $\tau_{mol} = 3 \cdot 10^{-10}$  s pour  $r = 1,09$  Å et  $\langle NT_1 \rangle = 160$  ms. Cette valeur est proche de celles trouvées pour les molécules repliées (angiotensine  $\tau_{mol} = 4,8 \cdot 10^{-10}$ ) (8) et cycliques (ocytocine  $\tau_{mol} = 5 \cdot 10^{-10}$ ) (14), bien que ces peptides possèdent des poids moléculaires plus grands.

Les trois chaînes latérales supportent des mouvements locaux différents. La chaîne de la Methionine possède d'importants degrés de liberté. A l'aide de [1] on calcule  $\tau_{int}^\beta = 1,2 \cdot 10^{-10}$  s et  $\tau_{int}^\alpha = 1 \cdot 10^{-10}$  s. Le phényle du résidu Phe tourne autour de l'axe  $CH_2\beta-C\zeta$  ( $NT_1C\zeta < NT_1C\delta$  et Ce). Enfin la tyrosine n'a pas de mouvement propre autour de l'axe  $CH_2\beta-C\zeta OH$  ( $NT_1C\delta, \epsilon - NT_1$  squelette).

\* La signification et les valeurs des différentes constantes  $\hbar$ ,  $\gamma$ ,  $A$ ,  $B$ ,  $C$ , sont données dans la référence 8.



Tous ces résultats sont en accord avec la conformation repliée de la Met-encephaline proposée par RMN  $^1\text{H}$  ( $\beta_1$  turn) (6). En particulier les mouvements de Phe et Met sont en accord avec les positions pseudo-équatoriale et pseudo-axiale de ces restes par rapport au  $\beta$  turn. Le comportement très particulier de la Met-encephaline est sans doute en rapport avec sa forte hydrophobie (15).

Les résultats de cette note renforcent l'hypothèse d'une interaction tête-queue entre les  $\text{COO}^-$  et  $\text{NH}_3^+$  terminaux. Le blocage du reste Tyr est peut être dû à des interactions OH-solvant mais il est tentant de l'attribuer à un poids prépondérant d'une conformation mimant la région opioïde. Dans ces conditions, la Met-encephaline se comporterait comme une structure rigide capable sans transconformation dépensière d'énergie de s'insérer dans le récepteur morphinique avec une constante d'association voisine de celles des opiacées rigides.

#### REMERCIEMENTS

Ce travail a bénéficié de l'aide du CNRS et de l'Université RENE DESCARTES.

#### REFERENCES

- 1) - J. Hughes, T.W. Smith, H.W. Kosterlitz, L.A. Fothergill, B.A. Morgan et H.R. Morris, Nature, **258**, 577 (1975).
- 2) - L. Iversen, Nature, **258**, 567 (1975).
- 3) - A.A. Waterfield, J. Hughes et H.W. Kosterlitz, Nature, **260**, 624 (1976).
- 4) - H.H. Büscher, R.C. Hill, D. Römer, F. Cardinaux, A. Closse, D. Hauser et J. Pless, Nature, **261**, 423 (1976).
- 5) - B.P. Roques, C. Garbay-Jaureguiberry, R. Oberlin, M. Anteunis et A.K. Lala, Nature, (1976) in press.
- 6) - C. Garbay-Jaureguiberry, B.P. Roques, R. Oberlin, M. Anteunis et A.K. Lala, Biochem. Biophys. Res. Comm., (1976) in press.
- 7) - R. Deslauriers et R.L. Somorjai, J. Amer. Chem. Soc., **98**, 1931 (1976).
- 8) - R. Deslauriers, A.C.M. Puiva, K. Schaumburg et I.C.P. Smith, Biochemistry, **14**, 878 (1975).
- 9) - R. Deslauriers et I.C.P. Smith, Topics in  $^{13}\text{C}$  NMR spectroscopy, vol. 2, G.C. Levy ed., Wiley Interscience (1975).
- 10) - F. Gurd, P. Lawson, D. Cochran, et E. Wenkert, J. Biol. Chem., **246**, 3725 (1971).
- 11) - R. Deslauriers, G.C. Levy, W.H. Mc Gregor, D. Sarantakis et I.C.P. Smith, Biochemistry, **14**, 4335 (1975).
- 12) - A. Allerhand et R. Komoroski, J. Amer. Chem. Soc., **95**, 8228 (1973).
- 13) - P. Keim, R.A. Vigna, A.M. Nigren, J.S. Morrow et F.R.N. Gurd, J. Biol. Chem., **249**, 4149 (1974).
- 14) - R. Deslauriers, I.C.P. Smith et R. Walter, J. Amer. Chem. Soc., **96**, 2289 (1974).
- 15) - M. Anteunis, A.K. Lala, B.P. Roques et C. Garbay-Jaureguiberry, Biochemistry (submitted).