



УДК 577.175.853'17.012.6:543.422.25

ИССЛЕДОВАНИЕ ПРОСТРАНСТВЕННОЙ СТРУКТУРЫ ЦИКЛИЧЕСКОГО АНАЛОГА БРАДИКИНИНА В РАСТВОРЕ МЕТОДАМИ ДВУМЕРНОЙ СПЕКТРОСКОПИИ ЯМР

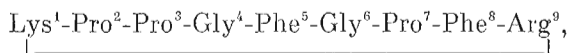
*Саулитис Ю. В., Лиешиньш Э. Э., Секацис И. П.,
Шендерович М. Д., Мутулис Ф. К., Мутуле И. Э.,
Чипенс Г. И.*

Институт органического синтеза Академии наук Латвийской ССР, Рига

Совместным анализом двумерных спектров COSY и NOESY выполнено отнесение сигналов ^1H -ЯМР [*cyclo*(9 \rightarrow 1 $^{\circ}$), Lys 1 , Gly 6]брадикинина (ЦБК) в $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$ и H_2O . Показано, что в растворе $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$ присутствуют два медленно обменивающихся конформера ЦБК; содержание минорного конформера не превышает 15%. В водном растворе минорный конформер отсутствует, а химические сдвиги протонов NH и $\text{C}^{\alpha}\text{H}$ ЦБК и природного пептида различаются незначительно. Основной конформер ЦБК в диметилсульфоксиде содержит по крайней мере два фрагмента X-Pro с *trans*-амидными группами и три экранированных от растворителя амидных протонов — NH остатков Phe 5 , Arg 9 и $\text{N}^{\epsilon}\text{H}$ остатка Lys 1 . Проанализирована система кросс-пиков спектра NOESY для ЦБК в $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$ и оценены максимальные расстояния между протонами остова соседних аминокислотных остатков. Показано, что экспериментальные данные хорошо согласуются с предположением о β -изгибе типа II в последовательности Pro 2 -Pro 3 -Gly 4 -Phe 5 . Предложены модели пространственной структуры остова фрагмента 6–9 ЦБК, содержащие две внутримолекулярные водородные связи с участием NH остатка Arg 9 , $\text{N}^{\epsilon}\text{H}$ остатка Lys 1 и карбоксильных групп остатков Phe 5 и Gly 6 .

Брадикинин (БК), нонапептидный биорегулятор, вызывает разнообразные физиологические эффекты, наиболее важные из которых — сокращение или расслабление экстравазальной гладкой мускулатуры бронхов, кишечника или матки, снижение артериального давления, повышение проницаемости капилляров, прямое стимулирование сердечной мышцы [1]. Пространственная структура БК и его линейных аналогов в растворе, знание которой необходимо для установления механизмов действия пептида на молекулярном уровне, интенсивно исследовалась различными физико-химическими методами. Комплекс исследований, проведенный В. Т. Ивановым с соавторами, методами КД-спектроскопии [2], флуоресцентного анализа [3], ЭПР- [4] и ^{13}C -ЯМР-спектроскопии [5] позволил сделать вывод о преобладании свернутых конформаций БК в растворе. В ряде работ [6, 7] высказано предположение о стабилизации пространственной структуры БК с помощью β -изгиба в последовательности Pro 2 -Pro 3 -Gly 4 -Phe 5 и γ -изгиба с участием Pro 7 . Энергетическая предпочтительность компактных свернутых конформаций БК установлена также методами теоретического конформационного анализа [8–10]. С другой стороны, на основании данных спектроскопии ЯМР высказывалось предположение о неупорядоченной пространственной структуре БК в водном растворе [8, 11].

Недавно в Институте органического синтеза АН ЛатвССР получен циклический аналог БК, [*cyclo*(9 \rightarrow 1 $^{\circ}$), Lys 1 , Gly 6]брадикинин (ЦБК):



Использованы следующие сокращения: БК, ЦБК — брадикинин и его циклический аналог, ЯЭО — ядерный эффект Оверхаузера, КССВ — константа спин-спинового взаимодействия. Для обозначения аминокислотных остатков применен трехбуквенный и однобуквенный коды: Arg — R, Lys — K, Pro — P, Gly — G и Phe — F.

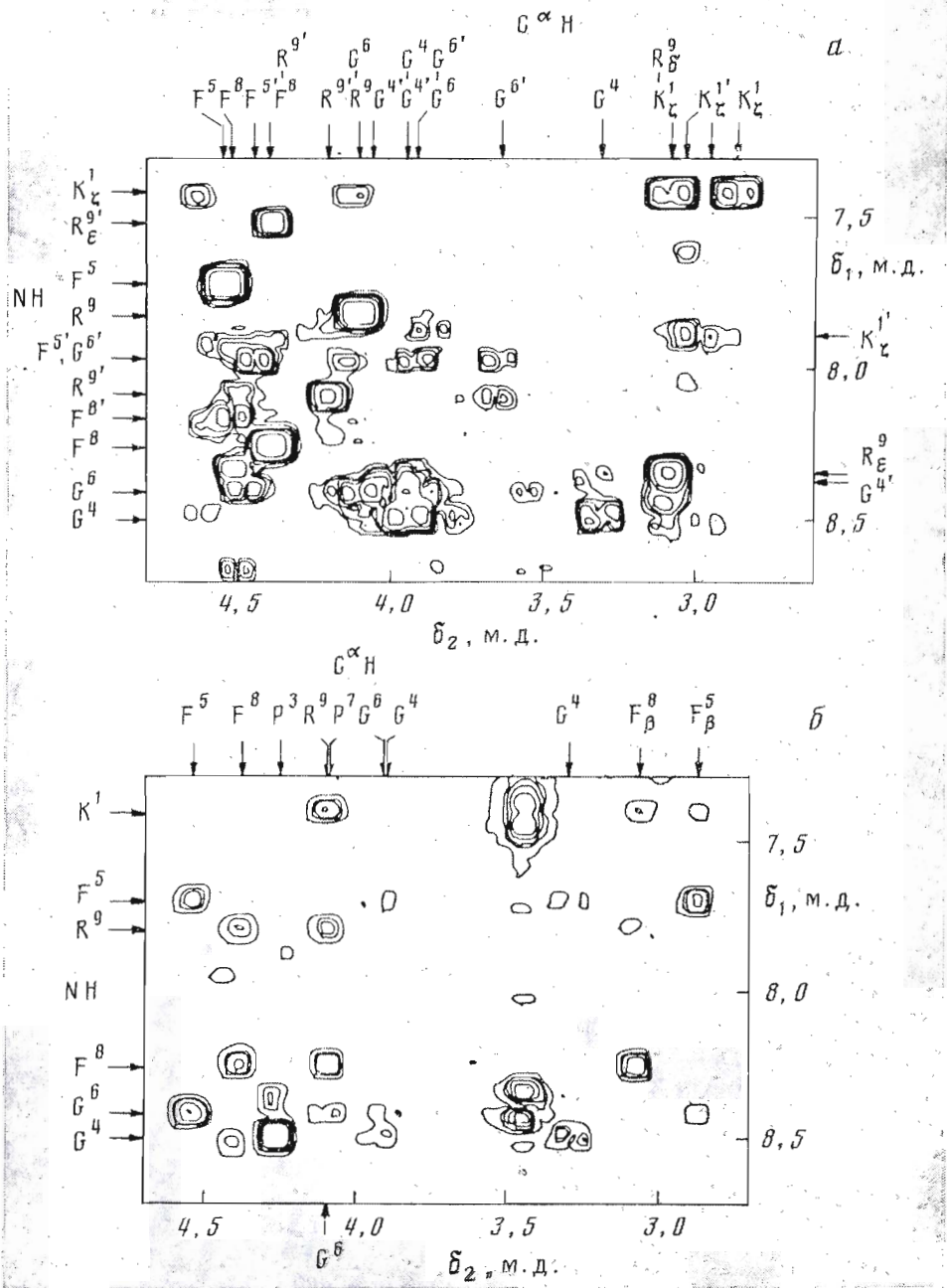


Рис. 1. Спектральные области δ_1 4,8–2,5 м.д., δ_2 8,7–7,3 м.д. двумерных 1H -ЯМР-спектров COSY (а) и NOESY (б) ЦБК в $(CD_3)_2SO$ при 303 К и $\tau_m=0.6$ с. Показано отнесение сигналов фрагментов NH – CH основной и боковых цепей ЦБК. С индексом указаны сигналы минорного изомера ЦБК

обладающий пролонгированным биологическим действием [12, 13]. Естественно предположить, что циклизация молекулы брадикипина посредством ϵ -аминогруппы остатка Lys^1 стабилизирует свернутые конформации молекулы. Данные теоретического конформационного анализа [14], а также необычный спектр биологической активности ЦБК [12, 13] указывают на возможные различия в пространственном строении природного пептида и циклического аналога в неполярных средах. С другой стороны, сходная форма спектров КД [15] может говорить о наличии общих элементов пространственной структуры обеих молекул в водном растворе.

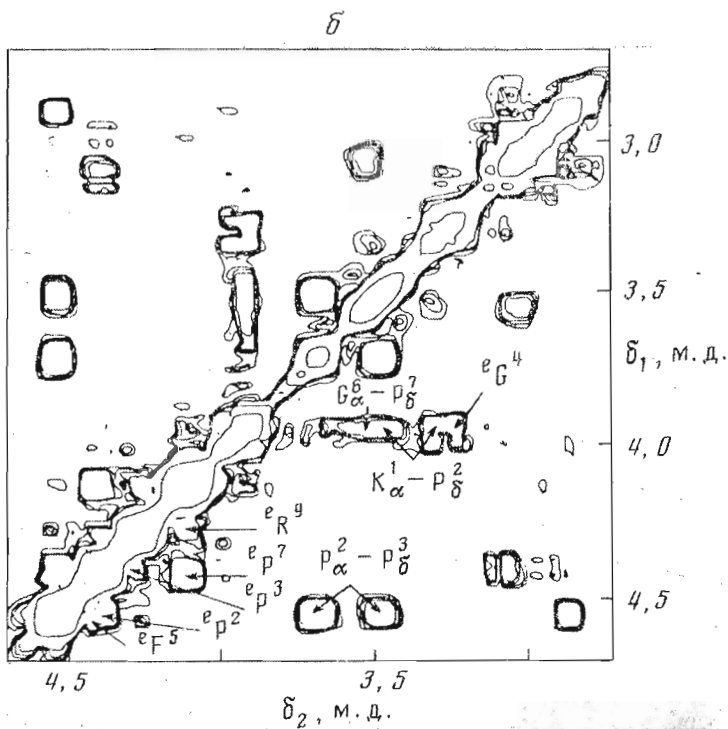
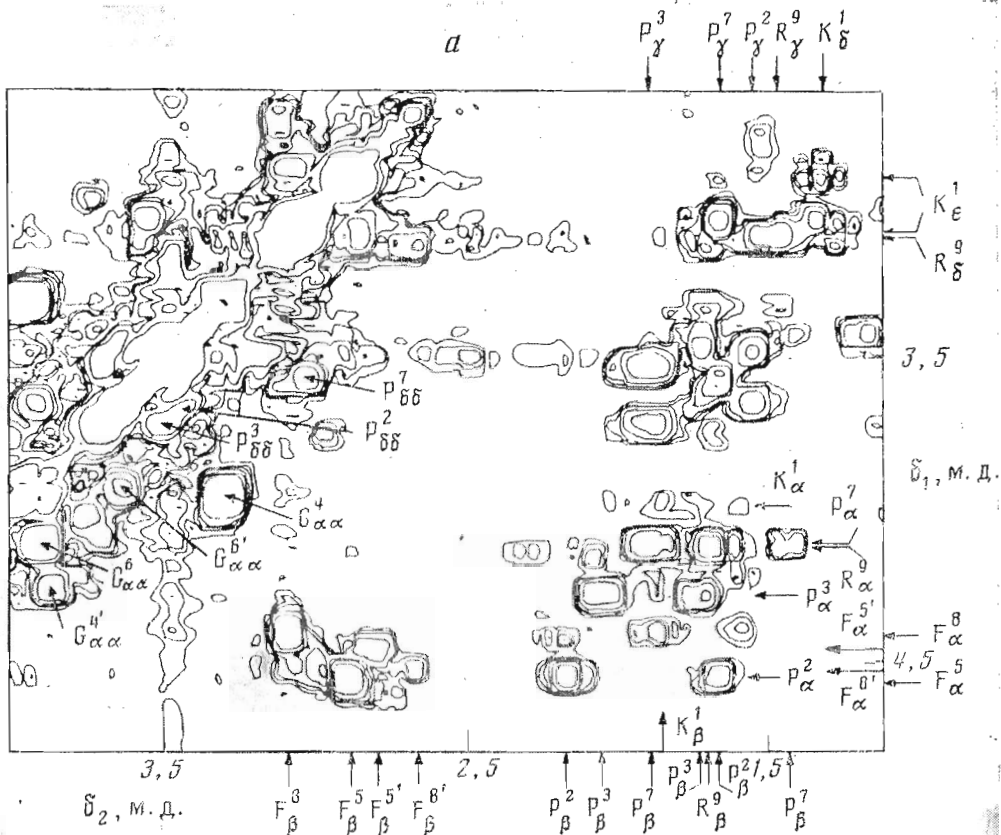


Рис. 2. Спектры ¹H-ЯМР COSY и NOESY ЦБК в (CD₃)₂SO: а – спектральная область δ₁ 4,8–2,6 м.д., δ₂ 4,0–1,1 м.д. COSY-спектра (с индексом указаны сигналы минорного конформера ЦБК); б – спектральная область δ₁ 4,7–2,7 м.д., δ₂ 4,7–2,7 м.д. NOESY-спектра (с индексом *e* указаны обменные кросс-пики, τ_m = 0,6 с). Показано отнесение геминальных CH₂- и вицинальных CH–CH-протонов

В настоящей работе проведено исследование ЦБК в диметилсульфоксиде и воде методами двумерной (2D) ^1H -ЯМР-спектроскопии. Отнесение сигналов протонов в спектрах выполнено с помощью методик COSY и NOESY [16, 17]. На основании данных спектроскопии ЯМР выдвинуты предположения об особенностях пространственной структуры ЦБК.

^1H -ЯМР и отнесение сигналов

В молекуле ЦБК содержатся три остатка Pro, по два остатка Phe и Gly. Поэтому полное отнесение сигналов спектра ^1H -ЯМР является весьма нетривиальной задачей, решение которой было достигнуто анализом 2D-ЯМР-спектров двух типов — COSY и NOESY.

Двумерная корреляционная спектроскопия COSY позволяет идентифицировать связанные спин-спиновым взаимодействием протоны. При-

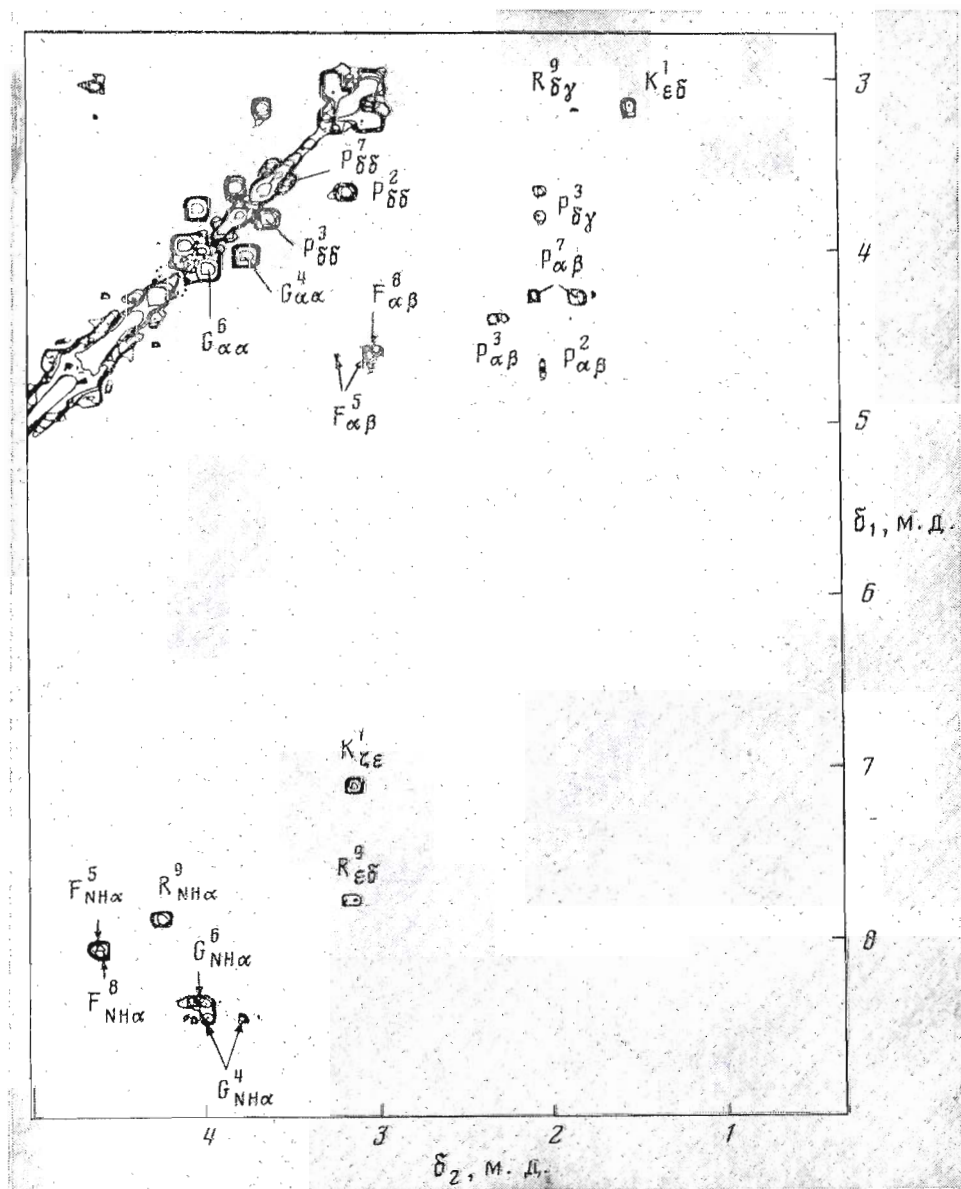


Рис. 3. Спектральная область δ_1 9–2,7 м. д., δ_2 5–0,5 м. д. ^1H -ЯМР COSY-спектра ЦБК в H_2O при 303 К. Показано отнесение протонов фрагментов NH—CH, CH—CH и протонов CH_2 -группы

менительно к пептидам это позволяет выделить сигналы протонов аминокислотных остатков одного типа. Анализ спектров COSY удобно начинать с определения спин-спиновой связи между протонами NH и C^αH, принадлежащими к одному остатку. В спектре COSY ЦБК в диметилсульфоксиде легко идентифицировать по соответствующим кросс-пикам сигналы NH и C^αH аминокислотных остатков Gly, Phe и Arg (рис. 1а). Далее можно выделить в спектре COSY кросс-пики, соответствующие спин-спиновому взаимодействию C^αH—C^βH₂ (рис. 2а), и провести отнесение сигналов β-протонов остатков Phe, Pro и Arg. Хорошо различимы в спектре COSY (рис. 2а) кросс-пики, соответствующие неэквивалентным водородам C^βH₂ остатка Pro, на основании которых найдено значение химического сдвига δ-протонов пролинов. Химический сдвиг α-протона остатка Lys¹ установлен анализом интегральных интенсивностей сигналов C^αH в одномерном спектре. Отнесение сигналов протонов боковых цепей Lys¹ и Arg⁹ может базироваться на кросс-пиках протонов N^εH—C^εH₂ остатка Lys и протонов N^εH—C^εH₂ остатка Arg* в спектре COSY (рис. 1а). Таким образом определены значения химических сдвигов ε- и δ-протонов остатка Lys¹ и δ- и γ-протонов остатка Arg⁹. Аналогично проведен анализ спектра COSY для водного раствора ЦБК (рис. 3).

Второй уровень отнесения, который предполагает определение положения каждой спиновой системы в аминокислотной последовательности, может быть достигнут с помощью 2D-спектроскопии NOESY, позволяющей наблюдать обмен магнитных состояний протонов вследствие кросс-релаксации или химического обмена в виде кросс-пигов в двумерном спектре. Кросс-релаксационные пики в спектре NOESY соответствуют ядерным эффектам Оверхаузера (ЯЭО), вызванным диполь-дипольными взаимодействиями между пространственно сближенными протонами [18]. Предельные межпротонные расстояния, приводящие к ЯЭО, составляют, по различным оценкам, 4–5 Å [19, 20], т. е. кросс-релаксационные пики в спектре NOESY соответствуют главным образом парам протонов, принадлежащих к одному и тому же или к двум соседним аминокислотным остаткам. Характерные типы протонных пар, расстояния между которыми принято обозначать d_1 , d_2 и d_3 , указаны на рис. 4. Кросс-релаксационные пики, отвечающие геминальным и вицинальным протонам в спектрах NOESY, легко находят сопоставлением спектров NOESY и COSY, а принадлежность отдельных протонов NH и C^αH соседним остаткам устанавливается по наличию кросс-релаксационных пигов

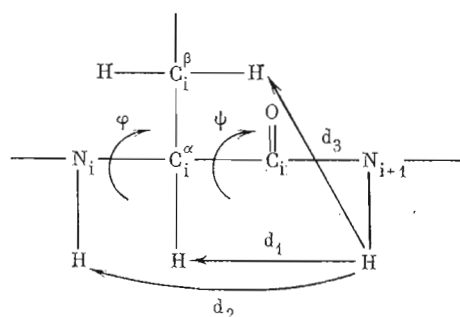


Рис. 4. Межпротонные расстояния d_1 , d_2 , d_3 в полипептидной цепи

в спектре NOESY, соответствующих d_1 - (рис. 1б) и/или d_2 -расстояниям (рис. 5). Выбор между сигналами протонов C^βH остатков Pro² и Pro⁷ оказался невозможным вследствие перекрывания резонансных частот C^αH предшествующих остатков Lys¹ и Gly⁶. Полная система d -расстояний молекулы ЦБК в (CD₃)₂SO, найденная при времени смешивания $\tau_m=0,9$ с,

* Для обозначения атомов в аминокислотных остатках использована номенклатура Правил NC IUPAC – IUB 1969 г. (см. Eur. J. Biochem., 1970, v. 17, p. 193–201).

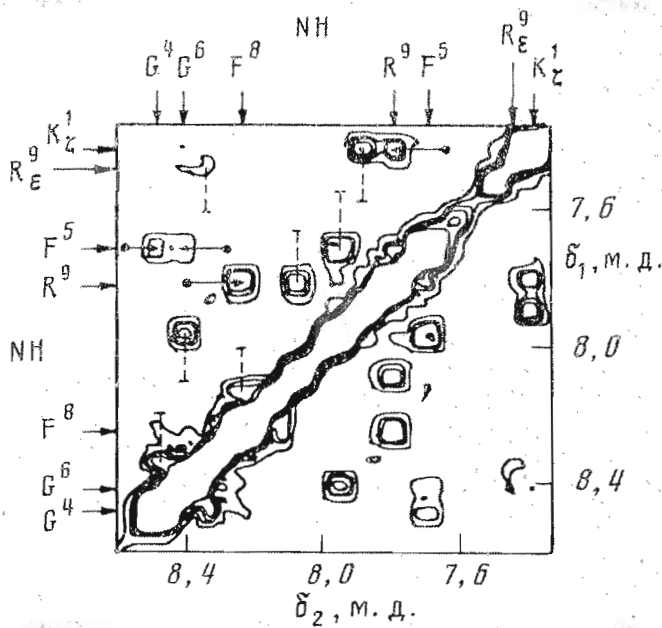


Рис. 5. Спектральная область ^1H -ЯМР NOESY-спектра δ_1 8,6–7,2 м. д., δ_2 8,6–7,24 м. д. ЦБК в $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$ при T 303 К, $\tau_m=0,6$ с. Отмечены a_2 -расстояния (\rightarrow), а также обменные кросс-пики (---), отвечающие NH-протонам соседних аминокислотных остатков

представлена на рис. 6 (выделены d -расстояния, сохраняющиеся при уменьшении времени смешивания до 0,1 с).

Отнесение сигналов ^1H -ЯМР ЦБК в водном растворе получено анализом спектра COSY (рис. 3) и сопоставлением со спектрами в диметилсульфоксиде. Значения химических сдвигов, констант спин-спиновой взаимодействия (КССВ) и температурных коэффициентов $\Delta\delta_{\text{NH}}/\Delta T$ для ЦБК в $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$ и H_2O представлены в табл. 1 и 2 соответственно.

Двойной набор сигналов протонов NH и C^αH и наличие обменных кросс-пигов в спектре NOESY указывают на существование двух медленно обменивающихся конформеров ЦБК в $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$. Содержание минорного конформера, определенное по интегральным интенсивностям амидных протонов, не превышает 15%. Положения обменных пиков протонов NH и C^αH в спектре NOESY и кросс-пиков COSY, соответствующих спин-спиновой связи вицинальных протонов, позволили провести отнесение сигналов протонов главной цепи и части протонов боковых цепей минорного конформера. Величины химических сдвигов, КССВ и температурных коэффициентов $\Delta\delta_{\text{NH}}/\Delta T$, соответствующие минорному конформеру ЦБК в $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$, приводятся в табл. 1 в скобках. В водном растворе ЦБК при заданных условиях эксперимента второй конформер не наблюдается.

Присутствие в растворе двух медленно обменивающихся во временной шкале ЯМР конформеров пролинсодержащего пептида обычно указывает на *цис-транс*-изомеризацию пептидных связей фрагмента X-Pro. Дискриминацию *цис*- и *транс*-изомеров пролина можно выполнить, используя химические сдвиги сигналов ^{13}C пирролидинового кольца [21] или анализируя протонные спектры NOESY [22]. Для *транс*-конфигурации связи фрагмента X-Pro характерно пространственное сближение одного или обоих δ -протонов с α -протоном предшествующего остатка X. В случае *цис*-конфигурации α -протон остатка X удален от δ -протонов, но может быть сближен с α -протоном остатка Pro. Таким образом, ЯЭО между $\text{C}_i^\alpha\text{H}$ и $\text{C}_{i+1}^\delta\text{H}$ указывают на *транс*-конфигурацию пептидной

Параметры спектров ¹H-ЯМР ЦБК в (CD₃)₂SO при T 303K

Амино-кислотный остаток	δ, м.д.				³ J _{NHSC^αH} , Гц	Δδ/ΔT · 10 ³ , м.д./К
	NH	C ^α H	C ^β H	другие протоны		
Lys ¹	*	3,95	*	C ^δ H 1,32 C ^ε H 3,04; 2,90 (2,98; 3,08) N ^ε H 7,44 (7,89)		2,3(N ^ε H)
Pro ²		4,55 (4,22)	1,65 2,18	C ^γ H 1,65 C ^β H 3,02; 3,55		
Pro ³		4,28 (4,13)	1,74 2,03	C ^γ H 1,88 C ^β H 3,55; 3,71		
Gly ⁴	8,49 (8,34)	3,32; 3,95 (3,87; 4,26)			4,3; 7,6	3,5
Phe ⁵	7,73 (7,97)	4,45 (4,45)	2,89 (2,72)		8,8	2,2
Gly ⁶	8,41 (7,98)	3,92; 4,12 (3,65; 3,92)			4,5; 8,4	6,3
Pro ⁷		4,13 (4,40)	1,45 1,90 (1,50; 1,80)	C ^γ H 1,74 C ^β H 3,46; 3,64		
Phe ⁸	8,26 (8,17)	4,40 (4,53)	3,10 (2,68)		8,4 (8,1)	3,2 (2,8)
Arg ⁹	7,83	4,12	1,71	C ^γ H 1,49 C ^β H 3,08 N ^ε H 8,37	8,4 (7,7)	1,2; 6,0(N ^ε H) (3,3)

* Сигналы протонов C^βH и C^γH остатка Lys¹ не удалось отнести, сигналы протонов α-NH₂ остатка Lys¹ и ζ-NH₂ остатка Arg⁹ не удалось наблюдать из-за сильного уширения вследствие быстрого обмена с протонами H₂O. В скобках приведены значения параметров, соответствующие минорному конформеру ЦБК.

Таблица 2

Параметры спектров ¹H-ЯМР ЦБК в H₂O при pH 3,85 и T 303K

Амино-кислотный остаток	δ, м.д.			³ J _{NHSC^αH} , Гц	Δδ/ΔT · 10 ³ , м.д./К
	NH	C ^α H	Другие протоны		
Lys ¹		4,22	C ^ε H 3,10; N ^ε H 7,06		
Pro ²		4,65	C ^δ H 3,13; 3,61; C ^β H 1,99		1,2(N ^ε H)
Pro ³		4,35	C ^δ H 3,58; 3,78; C ^β H 2,25, C ^γ H 2,01		
Gly ⁴	8,40	3,96; 4,06		5,9; 7,0	3,1
Phe ⁵	7,99	4,56	C ^β H 3,01; C ^β H 3,19	7,9	2,2
Gly ⁶	8,31	3,73; 3,94		5,6; 5,1	3,6
Pro ⁷		4,22	C ^δ H 3,46; 3,56; C ^β H 1,77; 2,04		
Pro ⁸	8,03	4,55	C ^β H 2,95; 3,03	7,8	3,4
Arg ⁹	7,84	4,21	C ^δ H 3,12; N ^ε H 7,73	7,5	1,8; 2,9(N ^ε H)

связи X-Pro, а ЯЭО C_iH^α-C_{i+1}H^α — на *цис*-конфигурацию. Интенсивные кросс-пики Pro² C^αH-C^δHPro³ в спектре NOESY (рис. 2б) однозначно указывают на *транс*-конфигурацию связи Pro²-Pro³ основного конформера ЦБК в (CD₃)₂SO. Группа частично перекрывающихся кросс-пилов наблюдается в области пересечения резонансных частот δ-протонов Pro² и Pro⁷ и α-протонов Lys¹, Gly⁶ (рис. 2б).

Следует отметить, что во взаимодействиях типа C_iH^α-C_{i+1}H^β не участвует один из α-протонов Gly⁶. Дополнительным аргументом в пользу *транс*-пептидной группы Lys¹-Pro² основного конформера ЦБК является отсутствие ЯЭО между α-протонами Lys¹ и Pro². Аналогичное рассуждение правильно также для группы Gly⁶-Pro⁷; таким образом, основной

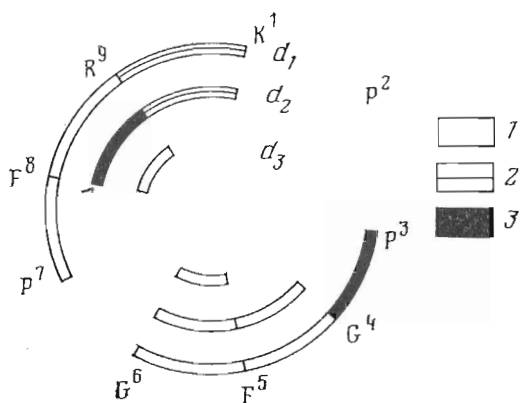


Рис. 6. Карта d -расстояний ЦБК в $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$, полученная методом NOESY при 303 К, $\tau_m=0,9$ с. Участки 1 указывают на ЯЭО для межпротонных расстояний d_1 , d_2 , d_3 , 2 - ЯЭО с участием протона N^{H} остатка Lys¹, 3 - ЯЭО при $\tau_m=0,1$ с

конформер ЦБК в диметилсульфоксиде содержит только *транс*-пептидные группы. Низкое содержание минорного конформера не позволяет наблюдать соответствующие ему ЯЭО в спектре NOESY и выявить расположение *цис*-пептидной связи, поэтому ниже обсуждаются лишь данные, относящиеся к главному конформеру.

В табл. 3 проведено сопоставление химических сдвигов протонов NH и C^αH ЦБК и природного брадикинина II в водном растворе. Близкие значения химических сдвигов, а также сходная форма кривых КД [15] указывают на наличие общих элементов пространственной структуры в обеих молекулах. В табл. 3 значения химических сдвигов амидных протонов ЦБК в $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$ и H_2O сопоставляются, кроме того, с величинами, характерными для амидных протонов тех же аминокислотных остатков в соединениях, моделирующих состояние статистического клубка [23, 24]. Наблюдается сильнополюсный сдвиг для сигналов протонов NH остатков Phe⁵ и Arg⁹ в ЦБК (табл. 3).

Недавно Вютрих с соавторами, используя химические сдвиги протонов в белках, нашел корреляционную зависимость между изменением химических сдвигов сигналов протонов, участвующих во внутримолекулярной водородной связи, и их расстоянием до карбонильной группы [25]. Из этой зависимости следует, что при расстояниях более 2 Å должны наблюдаться заметный сильнополюсный сдвиг сигналов NH-протонов, участвующих в водородной связи, относительно химических сдвигов амидных протонов в статистическом клубке. Эти результаты говорят в пользу сильнополюсного сдвига сигналов протонов NH остатков Phe⁵ и Arg⁹ в случае участия их во внутримолекулярной водородной связи в молекуле ЦБК. На наличие предпочтительной конформации ЦБК в растворе указывают различные КССВ $^3J_{\text{NH}\alpha\text{H}}$ остатка Gly, существенная неэквивалентность α -протонов Gly⁴ и Gly⁶ (более выражена в $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$,

Таблица 3

Сопоставление химических сдвигов отдельных аминокислотных остатков в ЦБК ($\delta^{\text{ЦБК}}$), БК ($\delta^{\text{БК}}$) [6] и в соединениях, моделирующих состояние беспорядочного клубка ($\delta^{\text{КЛ}}$) [23, 24]

Аминокислотный остаток	$\delta^{\text{ЦБК}}_{\text{NH}} - \delta^{\text{КЛ}}_{\text{NH}}$		$\delta^{\text{ЦБК}} - \delta^{\text{БК}}, \text{H}_2\text{O}$	
	$(\text{CD}_3)_2\text{SO}$	H_2O	NH	C ^α H
Pro ²				-0,13
Pro ³				0,09
Gly ⁴	0,34	-0,01	-0,02	0,12; 0,08
Phe ⁵	-0,41	-0,24	-0,04	0,02
Gly ⁶	0,26	0,08		
Pro ⁷				-0,09
Phe ⁸	0,12	-0,20	-0,02	-0,07
Arg ⁹	-0,24	-0,43	0,12	0,04

нежели в H_2O), а также низкие температурные коэффициенты $\Delta\delta_{NH}/\Delta T$ ряда амидных протонов.

Наименее чувствительными к изменению температуры оказались в обоих растворителях химические сдвиги протонов NH остатков Phe^5 , Arg^9 и протонов $N^{\epsilon}H$ остатка Lys^1 . Согласно данным, полученным при исследовании модельных пептидов [26], температурные коэффициенты $\Delta\delta_{NH}/\Delta T \leq 2 \cdot 10^{-3}$ м.д./К характерны для амидных протонов, участвующих в образовании внутримолекулярных водородных связей. Значения $\Delta\delta_{NH}/\Delta T$ для протонов $N^{\epsilon}H$ остатка Lys^1 сопоставимы с температурными коэффициентами протонов $N^{\epsilon}H$ остатка ϵ -аминокапроновой кислоты (Аса) в циклических трипептидах *cyclo(L-Ala-Gly-Aca)* [27] и *cyclo(D-Phe-L-Pro-Aca)* [28] ($\Delta\delta_{NH}/\Delta T = 3,3$ и $1,4 \cdot 10^{-3}$ м.д./К в $(CD_3)_2SO$). Указанные соединения имеют конформацию β -изгиба [27, 28] с экранированным от растворителя протоном $N^{\epsilon}H$ остатка Аса. Таким образом, величины $\Delta\delta_{NH}/\Delta T$ свидетельствуют, что протоны NH остатков Phe^5 , Arg^9 и протона $N^{\epsilon}H$ остатка Lys^1 ЦБК экранированы от растворителя, могут участвовать в образовании внутримолекулярных водородных связей. С другой стороны, величины $\Delta\delta_{NH}/\Delta T \approx 6 \cdot 10^{-3}$ м.д./К, наблюдаемые для протона NH остатка Gly^6 и протона $N^{\epsilon}H$ остатка Arg^9 в $(CD_3)_2SO$, характерны для протонов, полностью доступных растворителю [26].

Данные о межпротонных контактах, содержащиеся в двумерном спектре NOESY, также позволяют получить сведения о пространственной структуре ЦБК в диметилсульфоксиде. Диапазон межпротонных расстояний, приводящих к ЯЭО, существенно зависит от исследуемого объекта и условий эксперимента. Важным параметром, определяющим интенсивность кросс-пиков, является время смешивания τ_m [20]. В NOESY-спектре ЦБК, полученном при $\tau_m = 0,9$ с (рис. 1б, 5), наблюдаются пики, соответствующие всем возможным расстояниям d_1 и d_2 . Область изменения межпротонных расстояний d_1 составляет 2,2–3,6 Å, а расстояний d_2 – 2,0–4,7 Å, причем стерически разрешенные области значений углов ϕ , ψ , в которых одно из этих расстояний не превышает 3 Å, почти не перекрываются [29]. Часть кросс-пиков ЯЭО ЦБК при $\tau_m = 0,9$ с должна, таким образом, соответствовать межпротонным расстояниям более 3 Å. С другой стороны, отсутствие кросс-пиков типа

$C_i^{\alpha}H - C_{i+1}^{\delta}H$ для одного из α -протонов остатка Gly^6 позволяет оценить верхнюю границу чувствительности спектра NOESY при $\tau_m = 0,9$ с в 4,0 Å. Уменьшение τ_m до 0,1 с приводит к исчезновению большинства d_1 - и d_2 -пиков. Отсутствие в этом спектре NOESY части кросс-пиков, соответствующих парам вицинальных протонов $N_iH - C_{i+1}H$, расстояния между которыми не превышает 3,0 Å [29], позволяет оценить предельное межпротонное расстояние для d_1 - и d_2 -пиков, наблюдаемых при $\tau_m = 0,1$ с. Полученные таким образом максимальные расстояния d_1 и d_2 суммированы в табл. 4.

Совместный анализ системы межпротонных расстояний и температурных коэффициентов амидных протонов позволяет локализовать элементы вторичной структуры основного конформера ЦБК в диметилсульфоксиде. Так, низкие значения $\Delta\delta_{NH}/\Delta T$ для амидного протона $i+3$ и также d_2 -расстояние с участием $i+1$ и $i+2$ остатков весьма характерны для β -изгибов [29, 30]. Подобными свойствами обладают протоны NH остатков Phe^5 , Arg^9 и $N^{\epsilon}H$ остатка Lys^1 .

Образование спирали на N-концевом участке молекулы ЦБК исключается присутствием двух остатков пролина. С другой стороны, статистический анализ аминокислотных последовательностей белков с известной структурой [31, 32], данные рентгеноструктурного анализа и ЯМР-спектроскопии циклических пента- и гексапептидов [33–36] указывают на высокую вероятность β -изгиба в последовательности X-Pro-Gly-Y. Подобную структуру, стабилизированную водородной связью типа 4–1, имеет в кристалле трипептид Ac-Pro-Gly-Phe-OH [37]. Данные ЯМР хорошо согласуются с предположением о β -изгибе в последовательности Pro²-Pro³-Gly⁴-Phe⁵ ЦБК в $(CD_3)_2SO$. Помимо обсуждавшихся выше низ-

Оценки максимальных расстояний между протонами остова соседних аминокислотных остатков ЦБК в $(CD_3)_2SO$ по данным спектров NOESY

Аминокислотный остаток	Тип d -связи	Максимальное расстояние, Å	Аминокислотный остаток	Тип d -связи	Максимальное расстояние, Å
Pro ³	d_1	3,0	Phe ⁸	d_2	3,0
Gly ⁴	d_2	4,0	Arg ⁹	d_2	4,0
Phe ⁵	d_2	4,0			

кого значения $\Delta\delta/\Delta T$ для протона NH остатка Phe⁵ и d_2 -расстояния остатка Gly⁴ отметим следующие факты:

1. В конформации β -изгиба ожидается существенно асимметрическое расположение двух α -протонов остатка Gly⁴ относительно карбонильной группы остатка Pro³ и NH-группы остатка Gly⁴. Действительно, химические сдвиги двух α -протонов и вицинальные константы $^3J_{NH\alpha H}$ заметно различаются.

2. Вицинальные константы $^3J_{NH\alpha H}$ для остатка Gly⁴ (4,7 и 7,6 Гц) дают близкие к ожидаемым в β -изгибах значения угла внутреннего вращения $\varphi_4 \approx \pm 70^\circ$ [38].

3. Ожидаемые в конформации β -изгиба ($\varphi_5 \approx 0 \pm 30^\circ$) расстояния между амидными протонами Phe⁵ и α -протонами остатка Gly⁴ (3,2–3,4 Å) близки к максимально возможным расстояниям $N_{i+1}H-C_i^{\alpha}H$. Наблюдаемые в спектре NOESY при $\tau_m = 0,9; 0,6$ с кросс-пики фрагмента $N_5H-C_4^{\alpha}H$ действительно являются наименее интенсивными из серии пиков, соответствующих d_1 -расстояниям, и исчезают при $\tau_m = 0,1$ с.

В последовательности Pro-Gly стерически допустимы β -изгибы типа I (или близкого к нему типа III) и II. Согласно кристаллографическим данным, β -изгиб типа II встречается в этой последовательности значительно чаще типа I [34, 35, 37]. Ожидаемое межпротонное расстояние во фрагменте $N_iH-C_j^{\alpha}H$ для β -изгиба типа II составляет 2,2 Å, а для β -изгиба типа I (или III) – 3,2–3,6 Å. В последнем случае может наблюдаться лишь весьма слабый эффект Оверхаузера. В то же время этой паре протонов соответствует один из наиболее интенсивных кросс-пиков ЯЭО, сохраняющийся при $\tau_m = 0,1$ с. Таким образом, для последовательности Pro²-Pro³-Gly⁴-Phe⁵ ЦБК в диметилсульфоксиде наиболее вероятна конформация β -изгиба типа II.

Интерпретация данных ЯМР, относящихся к последовательности 6–9 ЦБК, не столь однозначна, как в случае N-концевого фрагмента молекулы. Предварительные результаты расчета конформационной энергии тетрапептида Ac-Gly-Pro-Phe-Arg-OMe и анализ возможности циклизации полной молекулы на моделях Дрейдинга показали, что с наблюдаемыми значениями $\Delta\delta_{NH}/\Delta T$ и системой d_2 -расстояний согласуются два варианта пространственной организации этого фрагмента ЦБК:

1) остатки Gly⁶-Pro⁷-Phe⁸-Arg⁹ образуют β -изгиб типа I, или III, стабилизированный водородной связью $(Arg^9)NH \dots OC(Gly^6)$, а взаимная ориентация группы $N^{\delta}H$ остатка Lys⁴ и группы CO остатка Phe⁵ допускает образование дополнительной водородной связи (рис. 7а);

2) тетрапептид 6–9 образует несколько деформированный виток правой α -спирали, стабилизированный двумя водородными связями $(Arg^9)NH \dots OC(Phe^5)$ и $(Lys^4)N^{\delta}H \dots OC(Gly^6)$ (рис. 7б).

Дипептид Gly⁶-Pro⁷ в отличие от сочетаний L-аминокислота – пролин может в принципе включаться в спиральные участки пептидных молекул.

Изменение акцептора водородной связи с участием протона NH остатка Arg⁹ и группой CO остатка Phe⁵ или Gly⁶ связано лишь с незначительной конформационной перестройкой дипептида Pro⁷-Phe⁸ (поворот угла ψ_8 приблизительно на 30°). Конформация остатка Phe⁵ в обоих случаях допускает близкий контакт между протонами NH остатка Phe⁵ и NH остатка Arg⁹. Обе модели различаются главным образом конформациями остат-

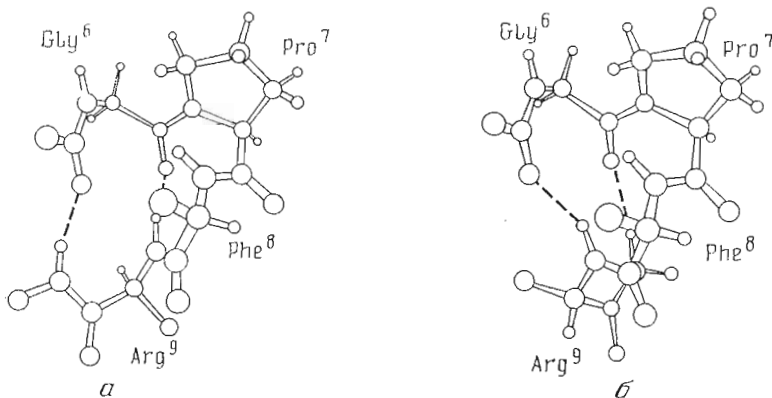


Рис. 7. Возможные модели пространственной структуры остова фрагмента Gly⁶-Pro⁷-Phe⁸-Arg⁹ ЦБК

ков Gly⁶ и Arg⁹, причем предполагаемая система водородных связей ограничивает значения угла внутреннего вращения ϕ_6 окрестностями 60 или -60° , что хорошо согласуется с наблюдаемыми вицинальными константами $^3J_{\text{NH}\alpha\text{H}}$ для остатка Gly⁶. Участвующая в водородной связи группа CO остатка Phe⁸ ориентирована внутрь молекулы, а принадлежащий той же пептидной группе протон остатка Gly⁶ — наружу. Обе модели предполагают, таким образом, взаимодействие этого протона с растворителем. Однако вицинальные константы $^3J_{\text{NH}\alpha\text{H}}$ для остатков Phe⁸ и Arg⁹ (8,4 Гц) превышают ожидаемые значения для остатков, принимающих участие в образовании α -спирали, что делает менее вероятной вторую модель.

Экспериментальная часть

Синтез [*cyclo*(9→1⁶), Lys¹, Gly⁶]брадикинина описан в работах [12, 13]. Двумерные ЯМР-спектры COSY и NOESY получены на спектрометре Bruker WM-360 с рабочей частотой 360 МГц, оснащенного ЭВМ Aspect 2000. Раствор ЦБК в H₂O при pH 7,0 очищали от парамагнитных примесей 8-меркаптохинолином. Затем последний удаляли экстрагированием CDCl₃, а раствор ЦБК в H₂O лиофилизировали. Спектры ¹H-ЯМР 0,037 М растворов ЦБК в (CD₃)₂SO снимали в 5-мм ампуле в интервале температур 293–333 К. В растворе H₂O спектры получены при pH 3,85. Для измерения pH водных растворов ЦБК использовали комбинированный электрод МГ 412 и электрометр ЭЦ-2.

Спектры COSY получены последовательно из двух неселективных 90-градусных импульсов [39]:

$$(90^\circ - t_1 - 90^\circ - t_2)_n,$$

где t_1 и t_2 — периоды эволюции и наблюдения сигналов. Время t_1 изменялось в интервале 0,1–51,2 мс с шагом 0,1 мс, что соответствует ширине спектра в направлении F_1 , 5000 Гц. Для улучшения отношения сигнал — шум эксперимент повторялся 128 раз при каждом значении t_1 .

Спектры NOESY получали, используя трехимпульсную последовательность [39]:

$$(90^\circ - t_1 - 90^\circ - \tau_m - 90^\circ - t_2)_n$$

при времени смешивания $\tau_m = 0,1; 0,3; 0,6; 0,9$ с. Время $\tau_m = 0,1$ с менялось в ходе эксперимента случайным образом в пределах 10% с целью подавления когерентного переноса намагниченности [39]. Остальные параметры накопления спектров COSY и NOESY совпадают. В обоих экспериментах после серии импульсов следовал промежуток времени 2 с для достижения равновесного состояния ядерной намагниченности. При накоплении спектров каждая из приведенных выше импульсных последователь-

ностей повторялась 16 раз с различными фазами неселективных 90-градусных импульсов и приемника, как описано в работе [39]. Для увеличения динамического диапазона спектров сигналы растворителя насыщали радиочастотным импульсом в течение всего эксперимента, за исключением времени наблюдения сигнала t_2 . Матрица данных COSY и NOESY, содержащая 512×2048 точек, дополнилась до размерности 2048×4096 , что соответствует разрешению 4,9 Гц на точку. Перед преобразованием Фурье матрицу данных умножали в направлениях t_1 и t_2 на следующие функции, уменьшающие полуширину сигналов в спектре:

$$\sin \left[\frac{t_1(\pi - \varphi)}{t_{s1}} + \varphi \right] \text{ для } t_1\text{-направления,}$$

$$\sin^2 \left[\frac{t_2(\pi - \varphi)}{t_{s2}} + \varphi \right] \text{ для } t_2\text{-направления,}$$

где t_{s1} и t_{s2} выбраны так, чтобы функции принимали нулевые значения для последних экспериментальных точек в t_1 - или t_2 -направлениях. Фазовые сдвиги φ в направлениях t_1 и t_2 составляли $\pi/64$ и $\pi/16$. После преобразования Фурье матрицу данных симметризовали таким образом, что симметричные матричные элементы заменились на их среднее геометрическое значение. Химические сдвиги сигналов в спектрах ^1H -ЯМР измерены относительно внутреннего стандарта *трет*-бутанола ($\delta=1,23$ м. д.) в H_2O и относительно тетраметилсилана в $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$ с точностью $\pm 0,01$ м. д. Точность измерения КССВ $\pm 0,2$ Гц, интервал температур для определения температурных коэффициентов 293–333 К, ошибка определения $\pm 10\%$.

ЛИТЕРАТУРА

1. Regoli D., Varabé J. *Pharmacol. Rev.*, 1980, v. 32, № 1, p. 1–46.
2. Иванов В. Т., Филатова М. П., Рейссман З., Реутова Т. О., Чехляева Н. М. *Биоорган. химия*, 1977, т. 3, № 9, с. 1157–1168.
3. Ефремов Е. С., Филатова М. П., Реутова Т. О., Степанова Л. Н., Рейссман З., Иванов В. Т. *Биоорган. химия*, 1977, т. 3, № 9, с. 1169–1179.
4. Филатова М. П., Рейссман З., Реутова Т. О., Иванов В. Т., Григорян Г. Л., Шапиров А. М. *Биоорган. химия*, 1977, т. 3, № 9, с. 1181–1189.
5. Ivanov V. T., Filatova M. P., Reissman Z., Reulova T. O., Efremov E. S., Pashkov V. S., Galaktionov S. G., Grigoryan G. L., Ovchinnikov Yu. A. In: *Peptides: chemistry, structure, biology*/Eds Walter R., Meinhofer J. N. Y.: Ann. Arbor, 1973, p. 151–157.
6. Lintner K., Femandjian S. *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*, 1979, v. 91, № 4, p. 803–811.
7. Cann J. R., Stewart J. M., London R. E., Matwiyoff N. A. *Biochemistry*, 1976, v. 15, № 1, p. 498–504.
8. London R. E., Stewart J. M., Cann J. R., Matwiyoff N. A. *Biochemistry*, 1978, v. 17, № 15, p. 2270–2277.
9. Никифорович Г. В., Галактионов С. Г., Чипенс Г. И. *Конформации пептидных биорегуляторов*. М.: Медицина, 1983, с. 70–84.
10. Галактионов С. Г., Шерман С. А., Шендерович М. Д., Никифорович Г. В., Леонова В. И. *Биоорган. химия*, 1977, т. 3, № 9, с. 1190–1197.
11. Denys L., Bothner-Bu A. A., Fisher G. H., Ryan J. W. *Biochemistry*, 1982, v. 21, № 25, p. 6531–6536.
12. Chipens G., Mutulis F., Galaktionow S. In: *Frontiers of bioorganic chemistry and molecular biology*/Ed. Ananchenko S. N. N. Y.: Pergamon Press, 1980, p. 99–103.
13. Chipens G., Nikiforovich G., Mutulis F., Veretennikova N., Vosekalna I., Sosnov A., Polevaya L., Ancans J., Mishlyakova N., Liepins E., Sekacis I., Breslav M. In: *Peptides, structure and biological function*/Eds Gross E., Meienhofer J. Rocford: Pierce Chem. Comp., 1979, p. 567–570.
14. Никифорович Г. В., Подицкий Л. У., Розенблют С. А., Чипенс Г. И. *Биоорган. химия*, 1984, т. 10, № 2, с. 170–175.
15. Chipens G., Mutulis F., Katayev B., Klusha V., Misina I., Myshlyaiakova N. *Int. J. Pept. and Prot. Res.*, 1981, v. 18, № 2, p. 302–311.
16. Aue W. P., Bartholdi E., Ernst R. R. *J. Chem. Phys.*, 1976, v. 64, № 5, p. 2229–2246.
17. Jeener J., Meier B. H., Bachmann P., Ernst R. R. *J. Chem. Phys.*, 1979, v. 71, № 11, p. 4546–4553.
18. Macura S., Ernst R. R. *Molec. Phys.*, 1980, v. 41, № 1, p. 95–117.
19. Braun W., Bösch C., Brown L. R., Go N., Wüthrich K. *Biochim. et biophys. acta*, 1981, v. 667, № 2, p. 377–396.
20. Keepers J. W., James T. L. *J. Magn. Reson.*, 1984, v. 57, № 3, p. 404–426.

21. Howarth O. W., Lilley D. M. J. *Progr. NMR Spectrosc.*, 1978, v. 12, p. 1-40.
22. Быстров В. Ф. *Впоорган. химия*, 1984, т. 10, № 8, с. 997-1043.
23. Bundi A., Gruthwohl C., Hochmann J., Keller R. M., Wagner G., Wüthrich K. *J. Magn. Reson.*, 1975, v. 18, № 1, p. 191-198.
24. Bundi A., Wüthrich K. *Biopolymers*, 1979, v. 18, № 2, p. 285-297.
25. Wagner G., Pardi A., Wüthrich K. *J. Amer. Chem. Soc.*, 1983, v. 105, № 20, p. 5948-5949.
26. Kopple K. D., Ohnishi M., Go A. J. *Amer. Chem. Soc.*, 1969, v. 91, № 13, p. 4264-4272.
27. Destlauriers R., Evans D. J., Leach S. J., Meinwald Y. C., Minasian E., Nemethy G., Rae I. D., Scheraga H. A., Somorjai R. L., Stimson E. R., Van Nispen J. W., Woody R. W. *Macromolecules*, 1981, v. 14, № 4, p. 985-996.
28. Lee S., Mizuno H., Nakamura H., Koderia Y., Kato T., Go N., Izumiya N. *FEBS Lett.*, 1984, v. 174, № 2, p. 310-313.
29. Shenderovich M. D., Nikiforovich G. V., Chipens G. I. *J. Magn. Reson.*, 1984, v. 59, № 1, p. 1-12.
30. Nemethy G., Scheraga H. A. *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*, 1980, v. 95, № 1, p. 320-327.
31. Chou P. Y., Fasman G. D. *J. Mol. Biol.*, 1977, v. 115, № 2, p. 135-175.
32. Ananthanarayanan V. S., Brahmachari S. K., Pattabiraman N. *Arch. Biochem. and Biophys.*, 1984, v. 232, № 2, p. 482-495.
33. Pease L. G., Watson C. J. *Amer. Chem. Soc.*, 1978, v. 100, № 4, p. 1279-1286.
34. Karle I. L. *Amer. Chem. Soc.*, 1978, v. 100, № 4, p. 1286-1289.
35. Kostansek E. C., Thiessen W. E., Schomburg D., Lipscomb W. N. *J. Amer. Chem. Soc.*, 1979, v. 101, № 49, p. 5811-5815.
36. Abu Khaled M., Sugano H., Urry D. W. *J. Chem. Soc. Perkin Trans II*, 1980, № 1, p. 206-211.
37. Brahmachari S. K., Bhat T. N., Sudhakar V., Vijayan M., Rapka R. S., Bhatnagar R. S., Ananthanarayanan V. S. *J. Amer. Chem. Soc.*, 1981, v. 103, № 7, p. 1703-1708.
38. Bystrov V. F., Ivanov V. T., Portnova S. L., Balashova T. A., Ovchinnikov Yu. A. *Tetrahedron*, 1973, v. 29, № 6, p. 873-877.
39. Wider G., Macura S., Kumar A., Ernst R. R., Wüthrich K. *J. Magn. Reson.*, 1984, v. 56, № 1, p. 207-234.

Поступила в редакцию
29.I.1985

CONFORMATION OF A CYCLIC ANALOGUE OF BRADYKININ IN SOLUTION STUDIED BY TWO-DIMENSIONAL ¹H NMR

SAULITIS J., LIEPINS E., SEKACIS I., SHENDEROVICH M.,
MUTULIS F., MUTULE I., CHIPENS G.

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

¹H NMR resonances of [*cyclo*(9→1⁶)Lys¹,Gly⁶]bradykinin (CBK) in (CD₃)₂SO and H₂O solution have been assigned by combined analysis of two-dimensional COSY and NOESY spectra. The presence of two slowly interchangeable conformers of CBK in (CD₃)₂SO is established, the minor conformer not exceeding 15% in the population. The minor conformer is absent from the aqueous solution, chemical shifts of the CBK and bradykinin NH and C^αH protons differ insignificantly. The major CBK conformer contains at least two X-Pro *trans*-peptide groups and three amide protons NH Phe⁵, NH Arg⁹ and N^εH Lys¹ protected from solvent. A system of cross-peaks from the NOESY spectra of CBK in (CD₃)₂SO has been analysed and the maximum distance between backbone protons and neighbouring amino acid residues evaluated. The experimental data agree well with the assumed type II β-bend in the sequence Pro²-Pro³-Gly⁴-Phe⁵. Spatial structure models for the backbone fragment 6-9 of CBK containing two intramolecular hydrogen bonds that involve the NH Arg⁹ and N^εH Lys¹ protons and the carbonyl groups of Phe⁵ and Gly⁴ are proposed.