



УДК 547.962

КОНФОРМАЦИОННЫЕ СОСТОЯНИЯ БРАДИКИНИНА В РАСТВОРЕ

Иванов В. Т., Филатова М. И., Райсман З.,
Реутова Т. О., Коган Г. А., Ефремов Е. С.,
Иашков В. С., Галактионов С. Г., Григорян Г. Л.,
Быстров В. Ф.

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

В настоящей работе представлено исследование пространственной структуры биологически активного линейного нонапептида брадикинина $\text{Arg}^1\text{-Pro}^2\text{-Pro}^3\text{-Gly}^4\text{-Phe}^5\text{-Ser}^6\text{-Pro}^7\text{-Phe}^8\text{-Arg}^9$. Для решения поставленной задачи мы использовали комплексный подход, включающий набор спектральных методов в сочетании с теоретическим конформационным анализом.

Нам были сняты спектры КД брадикинина и его аналогов в воде, этаноле и смеси этанол—гептан (1 : 1), а также проведено изучение температурной зависимости. При этом было обнаружено, что положение и знаки эффектов Коттона слабо зависят от природы растворителя; кривая КД водного раствора практически не меняется в интервале pH 1,5—9,0 и в интервале концентраций 10^{-2} — 10^{-4} М. Полученные данные указывают на высокую устойчивость пространственной организации гормона и его низкую склонность к агрегации. Во всех исследованных растворителях нагревание раствора приводит к снижению интенсивности положительной полосы при ~ 222 нм, а охлаждение — к ее усилению. По-видимому, этот эффект связан с фиксированием определенной пространственной ориентации фенильных радикалов по отношению к пептидному остову при охлаждении и ее «разупорядочивании» при нагревании.

Из анализа спектров ^{13}C -ЯМР (в D_2O) следует, что все три пептидные связи X-Pro брадикинина имеют *транс*-конфигурацию в исследованном диапазоне pH 2,5—8,1. Химические сдвиги $^{13}\text{C}^\beta$ и $^{13}\text{C}^\gamma$ составляют соответственно 29,0—30,6 м. д. и 25,3—25,9 м. д. (относительно тетраметилсилана), а их разность — 3,4—5,3 м. д., что отвечает *транс*-конфигурации связи X-Pro [1, 2].

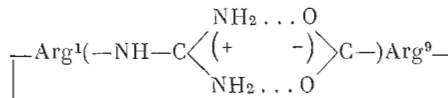
При наблюдении за химическими сдвигами ^{13}C при возрастании pH от 2,5 до 8,1 (табл. 1) отмечен ожидаемый [3] pH-переход для сигналов с $\rho_K \sim 8$ от карбонильных C' , C^β , C^γ и C^δ атомов N-концевого Arg^1 остатка, обусловленный титрованием N-концевой аминогруппы. Однако в обычной области титрования C-концевой карбонильной группы (pH 2,5—5,0) [3] не происходит изменения химических сдвигов ^{13}C . В спектрах ^1H -ЯМР при возрастании pH от 2,5 до 7,0 также не наблюдается изме-

Химические сдвиги ^{13}C брадикинина в водном растворе

Углеродные атомы аминокислотных остатков	δ , м.д. при pH		Углеродные атомы аминокислотных остатков	δ , м.д. при pH	
	2,5	8,1		2,5	8,1
Карбонилы			C^β		
Pro ³	175,8; 174,7; 173,7; 172,1; 171,1	175,9; 174,7; 173,8; 172,2; 171,0	Phe ⁵	38,4; 37,8	38,4; 37,9
Gly ⁴					
Phe ⁶					
Ser ⁶					
Pro ⁷					
Arg ⁹			30,5	30,5	
Pro ²			29,2	29,3	
Arg ⁹	29,0	29,0			
Phe ⁸	173,9	173,9	Arg ¹	28,1	29,6
Pro ²	172,9	173,1	Ser ⁶	62,2	62,3
Arg ¹	168,8	171,7			
Фенильные кольца Phe⁵; Phe⁶			C^γ		
C ₁	137,3; 137,2;	137,3	Arg ⁹	25,8; 25,3	25,9; 25,4
C ₂	130,2	130,3			
C ₃	129,8	130,0			
C ₄	128,3	128,5			
C^α			Pro ⁷	24,3	24,7
Pro ³ , Pro ⁷	61,8	61,9	C^δ		
Pro ²	60,3	60,2	Pro ² , Pro ³ , Pro ⁷	49,1; 48,9	49,2; 49,0
Arg ¹	54,1	54,2	Arg ¹	41,7	41,9
Arg ⁹	53,4	53,4	Arg ⁹	41,6	41,7
Ser ⁶	56,1; 55,9;	56,2; 56,0	C^ϵ		
Phe ⁶					
Phe ⁸	52,6	52,6	Arg ¹	157,9; 158,0	157,9
Gly ⁴	43,5	43,5	Arg ⁹		

нений химических сдвигов амидных NH протонов. Следует отметить, что для пептидов Phe-Arg, Pro-Phe-Arg и Gly-Pro-Phe-Arg, отвечающих C-концевой последовательности брадикинина, наблюдается нормальное титрование карбоксильной группы. Поэтому anomальное поведение (отсутствие титрования) карбоксильной группы Arg⁹ остатка брадикинина мы предлагаем объяснить образованием ею прочной солевой связи с гуанидиновой группировкой N-концевого Arg¹ остатка.

Таким образом, в диапазоне pH 2—8 гормон имеет конформацию, замкнутую в цикл солевой связью



При увеличении pH выше 8,5 наблюдается появление новых сигналов в спектре ^{13}C -ЯМР. При обратном титровании (уменьшении pH от 10,6 до 1,8) наблюдается нормальная картина изменения химических сдвигов Arg⁹, отвечающая титрованию карбоксильной группы с $pK \sim 4$. Очевидно, в щелочной среде происходит необратимое разрушение пространственной структуры брадикинина.

Методом расчета [4], учитывающим *транс*-конфигурацию связей X-Pro, выполнен конформационный анализ молекулы брадикинина. При

Параметры углов Φ , Ψ (в градусах) для четырех наиболее энергетически выгодных конформаций брадикинина

Конформация	Arg ¹		Pro ²		Gly ¹		Phe ⁵		Ser ⁶		Pro ⁷		Phe ⁸		Arg ⁹		Относительная энергия, ккал/моль	
	Φ	Ψ	Ψ^*	Φ	Φ	Ψ	Φ	Ψ	Φ	Ψ	Ψ^*	Φ	Ψ	Φ	Ψ	Φ		Ψ
I	-169	126	122	138	89	-71	-141	147	-126	127	-43	-167	-52	-141	-23			0
II	-168	104	214	-30	-74	-63	-116	131	-91	125	-49	-147	-55	-137	-40			1,5
III	-171	109	134	127	63	34	-154	146	-131	105	-44	-146	-51	-134	-32			2,0
IV	-165	123	133	-36	102	51	-155	143	-126	119	-40	-160	-51	-136	-34			4,7

* Угол Φ принят -60° .

Сравнение значений расстояний (в ангстремах) между метками в молекуле брадикинина, определенных с помощью методов флуоресценции и ЭПР и вычисленных путем теоретического конформационного анализа

Конформация	DNSArg ¹ — Tyr ⁶		DNSArg ¹ — Tyr ⁸		SLArg ¹ — LSer ⁶		SLArg ¹ — SLTyr ⁶		SLArg ¹ — SLTyr ⁸		SLTyr ⁶ — SLTyr ⁸	
	вычислено	определено	вычислено	определено	вычислено	определено	вычислено	определено	вычислено	определено	вычислено	определено
I	13,9		12,0								12,4	
II	11,6		10,2		10,8		17,2		14,8		10,5	
III		15,5		11,1	11,9		15,1		15,4			14,8
IV	11,4		10,8		13,8		14,8		14,6		10,2	
	10,7		16,1		13,9		13,5		17,6		13,2	
					13,3		18,9					12,1

этом были найдены четыре наиболее энергетически выгодные формы (табл. 2) гормона. Все они содержат солевой мостик, предсказанный на основании спектров ЯМР, и различаются пространственным строением участка $\text{Pro}^3\text{-Gly}^4$. У всех четырех структур возможно образование гидрофобной «стопки» из двух фенильных и одного пирролидинового цикла. Для вышеупомянутых конформеров были рассчитаны расстояния между некоторыми аминокислотными остатками в молекуле нонапептида, которые были впоследствии измерены экспериментально. По спектрам флуоресценции были определены расстояния между донором-оксифенилом и акцептором-дансилом (DNS) в синтезированных дансильных производных брадикинина в воде при 25° (табл. 3). Далее, из спектров электронного парамагнитного резонанса (ЭПР) спин-меченых производных нонапептида, содержащих два стабильных иминокислородных радикала (SL), были измерены межспиновые расстояния (табл. 3). Исследование расстояний также исключает из рассмотрения вытянутую структуру гормона и согласуется с упомянутым выше циклическим типом ее построения.

Таким образом, в работе найден новый принцип формирования пространственной структуры линейных пептидов — образование циклических конформаций за счет ионных взаимодействий поногенных групп, расположенных на противоположных концах молекулы. Впервые выполнен детальный конформационный анализ пептидного гормона в растворах и определены доминирующие пространственные формы брадикинина.

ЛИТЕРАТУРА

1. Dorman D. E., Bovey F. A. (1973) *J. Org. Chem.*, 38, 2379.
2. Blout E. R. (1974) VI International Conference on Magnetic Resonance in Biological Systems, Kandersteg.
3. Christl M., Roberts J. D. (1972) *J. Am. Chem. Soc.* 94, 4565.
4. Галактионов С. Г., Никифорович Г. В., Перельман Т. Л. (1974) Диффузия в сложных молекулярных структурах, «Наука и техника», Минск.

Поступило в редакцию
17.VI. 1975

Технический редактор *Е. С. Кузьмишина*

Сдано в набор 20/V-1975 г.	Т-11538	Подписано к печати 8/VII-1975 г.	Тираж 900 экз.
Зак. 2360	Формат бумаги 70×108 ^{1/16}	Усл. печ. л. 12,6	Бум л. 4,5
			Уч.-изд. л. 13,2

2-я типография издательства «Наука». Москва, Шубинский пер., 10