



УДК 577.175.82/17.088.53:543.422.25

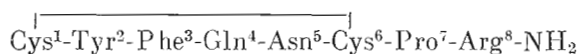
ИССЛЕДОВАНИЕ ПРОСТРАНСТВЕННОЙ СТРУКТУРЫ des-Gly⁹-[Arg⁸]ВАЗОПРЕССИНА МЕТОДАМИ ДВУМЕРНОЙ СПЕКТРОСКОПИИ ЯМР И ТЕОРЕТИЧЕСКОГО КОНФОРМАЦИОННОГО АНАЛИЗА

*Шендерович М. Д., Секацис И. П., Лиешиньш Э. Э.,
Нижифорович Г. В., Пансевичи О. С.*

Институт органического синтеза Академии наук ЛатвССР, Рига

Методами 2D-спектроскопии выполнено отнесение сигналов ¹H-ЯМР des-Gly⁹-[Arg⁸]вазопрессина в диметилсульфоксиде. Получены КССВ и температурные коэффициенты Δδ/ΔT для амидных протонов, проанализирована система кросс-пиков ЯЭО в двумерном спектре NOESY. Наиболее существенную информацию о пространственной структуре des-Gly⁹-[Arg⁸]вазопрессина дают низкий температурный коэффициент Δδ/ΔT амидного протона Asn⁵ и ЯЭО между α-протонами Cys¹ и Cys⁶. Предполагается, что экранирование протона NH остатка Asn⁵ от растворителя связано с β-изгибом остова в последовательности 2–5, а расстояние между C^αN остатков Cys¹ и Cys⁶ не превышает 4 Å. С учетом этих ограничений проведен теоретический конформационный анализ молекулы. Полученная группа низкоэнергетических конформаций остова сопоставляется с полным набором данных ЯМР. Показано, что наиболее вероятной конформацией циклической части des-Gly⁹-[Arg⁸]вазопрессина является β-изгиб III с угловыми остатками 3, 4 и вытянутыми участками 1–2 и 5–6. Некоторые данные ЯМР указывают на динамическое равновесие между этой структурой и другими шворными конформерами.

Развитые в последние годы методы двумерной (2D) спектроскопии ¹H-ЯМР существенно упрощают процедуру отнесения сигналов протонов и позволяют детально описать систему близких межпротонных контактов в изучаемых соединениях [1–3]. С применением 2D-ЯМР-спектроскопии связаны значительные успехи в исследовании пространственной структуры белков в растворе (см., например, [4–6]), однако эти методы сравнительно редко использовались для изучения небольших пептидов. В настоящей работе представлены результаты одномерной и двумерной ¹H-ЯМР-спектроскопии синтезированного в Институте органического синтеза АН ЛатвССР des-Gly⁹-[Arg⁸]вазопрессина — октапептида с аминокислотной последовательностью



Нейрогипофизарные гормоны окситоцин, вазопрессин и их аналоги интенсивно изучались традиционными методами ЯМР [7]. Поэтому в исследовании DGA-вазопрессина методами 2D-ЯМР-спектроскопии наряду с данными о пространственной структуре нового аналога может быть получена полезная информация методического характера.

Исследование пространственной структуры пептидов и белков методами ЯМР базируется на аналитических и эмпирических закономерностях [1, 8], связывающих отдельные характеристики спектров ЯМР и конформационные параметры молекул (углы внутреннего вращения, межпротонные расстояния и т. п.). Использование подобных закономерностей для небольших олигопептидов осложняется значительной конформационной лабильностью их молекул в растворе: часть наблюдаемых в эксперименте харак-

Принятые сокращения: DGA-вазопрессин — des-Gly⁹-[Arg⁸]вазопрессин, 2D-ЯМР — двумерный ядерный магнитный резонанс, COSY — двумерная корреляционная спектроскопия, NOESY — двумерная спектроскопия ядерного эффекта Оверхаузера, ЯЭО — ядерный эффект Оверхаузера, КССВ — константа спин-спинового взаимодействия.

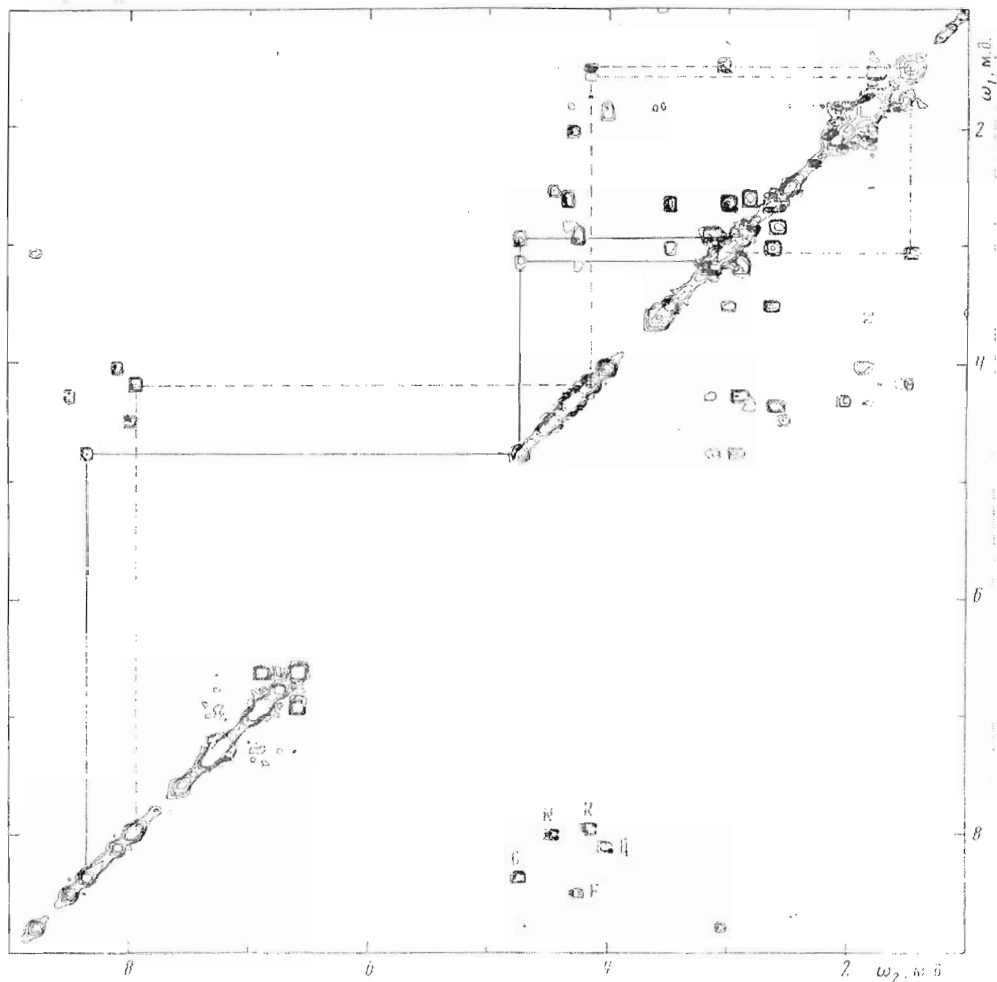


Рис. 1. Спектр COSY DGA-вазопрессина в диметилсульфоксиде при 35° С. Сплошной линией указаны J -связи в аминокислотном остатке Cys⁶, а пунктиром — в Arg⁸. Крест-пикки J -связей NH—C^αH обозначены символами соответствующих остатков в однобуквенном коде

теристик в этом случае может являться результатом статистического усреднения по нескольким существенно различным значениям конформационных параметров. Поэтому для нейрогипофизарных гормонов, конформационная жесткость которых вызывает определенные сомнения [7], вычисление «точных» значений углов внутреннего вращения φ из КССВ ${}^3J_{\text{HNC}^\alpha\text{H}}$ [9] представляется необоснованным.

Для ограничения круга возможных конформаций DGA-вазопрессина в диметилсульфоксиде отобраны данные ЯМР, определяющие относительно инвариантные элементы пространственной структуры молекулы. В результате теоретического конформационного анализа, проведенного с учетом таких экспериментальных ограничений, выделена группа конформеров, характеризующихся низкими значениями энергии внутримолекулярных взаимодействий. Сопоставление этой группы конформеров с полным набором данных ЯМР позволило определить конформацию остова циклической части молекулы, реализация которой в диметилсульфоксиде представляется наиболее вероятной.

Отнесение сигналов протонов DGA-вазопрессина достигнуто совместным анализом 2D-спектров COSY и NOESY. В спектре COSY (рис. 1) выделены все спиновые системы, относящиеся к отдельным аминокислотным остаткам. Сходные спиновые системы остатков Tyr², Phe² и Cys⁶ иден-

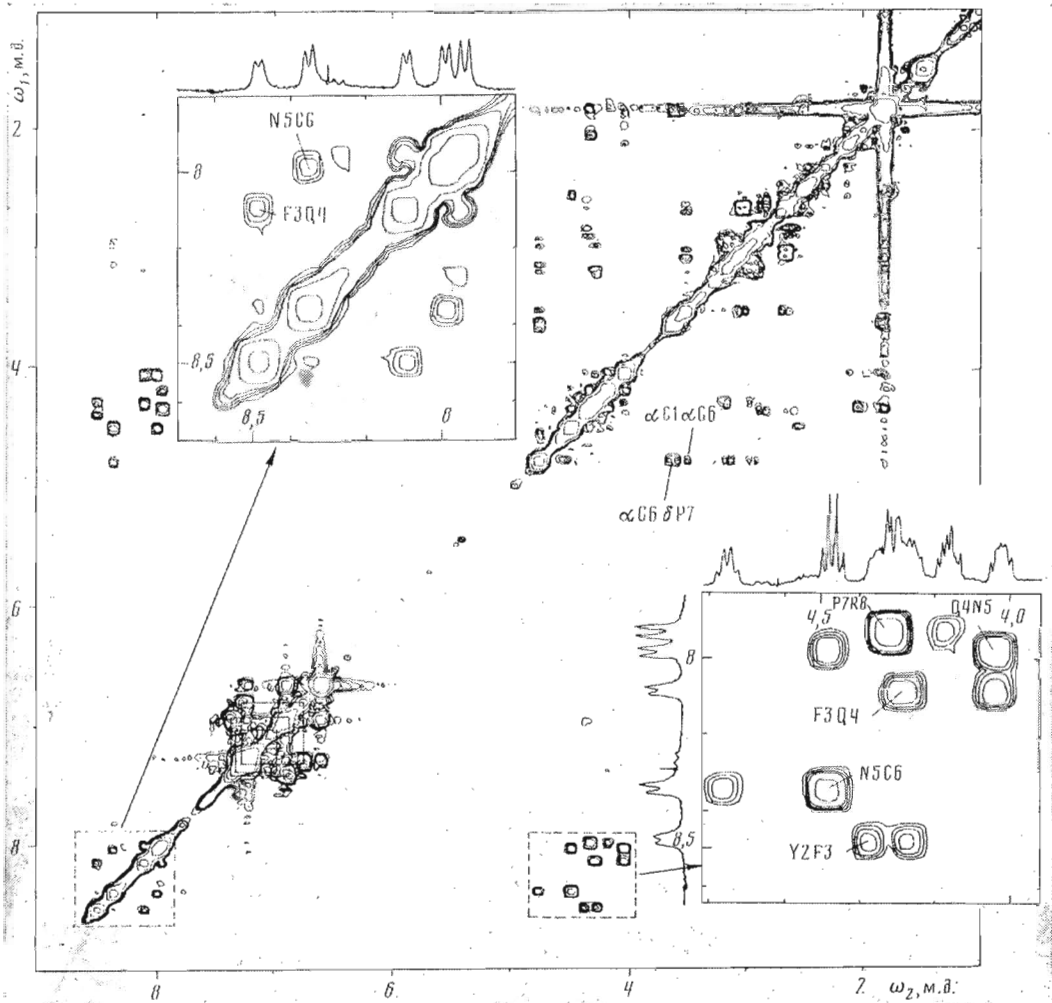


Рис. 2. Спектр NOESY DGA-вазопрессина в диметилсульфоксиде при 35° С. Сильные полосы при химическом сдвиге 1,81 м.д. обусловлены резонансным сигналом ацетата. Сплошными линиями соединены кросс-пики, вызванные химическим обменом протонов в амидных группах. В участках, выделенных пунктирной линией, показано отнесение d_1 - и d_2 -связей. Аминокислотные остатки обозначены в однобуквенном коде

тифицировались по кросс-пикам ЯЭО между парами протонов $C_i^2H-N_{i+1}H$ или $N_iH-N_{i+1}H$ (d_1 - и d_2 -связи) [10] в спектре NOESY.

Общее представление о полученных 2D-спектрах DGA-вазопрессина в диметилсульфоксиде дают рис. 1 и 2. Число кросс-пигов в спектре COSY соответствует количеству, ожидаемому согласно аминокислотной последовательности пептида. В 2D-спектрах отсутствуют кросс-пики, связанные с амидным протоном $Tu\gamma^2$, сигнал которого сильно уширен в одномерном спектре быстрым обменом вследствие индуктивного эффекта N-концевой аминогруппы. Некоторые характеристики 1H -ЯМР-спектров DGA-вазопрессина приведены в табл. 1.

Интерпретация данных ЯМР. К данным 1H -ЯМР, характеризующим конформационные состояния пептидов в растворе, относят обычно vicinalные КССВ, ЯЭО и температурные коэффициенты химических сдвигов амидных протонов. Интерпретационная ценность экспериментального набора данных существенно зависит от наблюдаемых значений указанных характеристик.

В vicinalные константы $^3J_{HN^i\alpha H}$ DGA-вазопрессина в диметилсульфоксиде, лежащие в интервале 6,3–8,1 Гц, не позволяют сколько-нибудь

Химические сдвиги (δ , м. д.) протонов, температурные коэффициенты ($\Delta\delta/\Delta T$) амидных протонов и константы спин-спинового взаимодействия DС₂А-вазопрессина в диметилсульфоксиде при 35° С

АМИНО- ОСТАТОК	$\Delta\delta/\Delta T \cdot 10^3$ м.д./К	δ , м.д.						$^3J_{\text{HNC}\alpha\text{H}}$	$^3J_{\text{HC}\alpha\text{C}\beta\text{H}}$
		NH	C α H	C β H	Другие протоны	Г γ	Г δ		
Cys ¹	—	—	3,50	2,65; 3,02					8,4; 5,5
Tyr ²	—	8,33	4,35	2,60; 2,84	6,61 (C ² H ₂); 6,91 (C ³ H ₂)				10,0; 5,1
Phe ³	6,3	8,49	4,26	2,92; 3,15	7,2-7,3 (C ₆ H ₅)		7,1		10,5; 4,8
Gln ⁴	4,3	8,08	4,02	1,83; 1,90	2,0-2,1 (C ² H ₂); 7,29; 6,76 (N ² H ₂)		6,3		
Asn ⁵	0,3	7,99	4,47	2,55	7,37; 6,88 (N ³ H ₂)		7,0		
Cys ⁶	7,6	8,35	4,75	2,95; 3,12	4,85 (C ² H ₂); 3,61 (C ³ H ₂)		7,5		7,5; 5,4
Pro ⁷	—	—	4,30	1,85; 2,03	1,5 (C ² H ₂); 3,05 (C ³ H ₂); 8,76 (N ² H); 7,33; 6,98 (NH ₂)				
Arg ⁸	4,3	7,94	4,16	1,50; 1,58					8,1

надежно ограничить область изменения углов внутреннего вращения ϕ [8]. Следует отметить лишь существенное различие констант ${}^3J_{\text{HNC}}^{\alpha\text{H}}$ для остатка в положении 3 DGA-вазопрессина и окситоцина [11] (7,1 и 4,4 Гц соответственно).

В отсутствие четких количественных характеристик интенсивности кросс-пиков малоинформативными оказываются также данные о ЯЭО между протонами, принадлежащими соседним аминокислотным остаткам. Вютрих с соавт. [12], а также Киперс и Джеймс [13] считают, что наблюдение кросс-пиков в спектре NOESY возможно в определенных экспериментальных условиях при межпротонных расстояниях до 5 Å. Даже полагая, что в случае небольших пептидов эта оценка несколько завышена, следует ожидать появления ЯЭО для всех пар протонов $\text{C}_i^{\alpha}\text{H}-\text{N}_{i+1}\text{H}$ и значительной части пар $\text{N}_i\text{H}-\text{N}_{i+1}\text{H}$ (максимальные межпротонные расстояния 3,6 и 4,8 Å соответственно [14]). Действительно, в NOESY-спектре DGA-вазопрессина (рис. 2) наблюдаются все однозначно идентифицируемые d_1 - и d_2 -связи. С другой стороны, в спектрах NOESY олигопептидов обычно не наблюдаются ЯЭО между протонами $\text{C}_i^{\alpha}\text{H}$ и N_{i+1}H (d_3 -связи) и ЯЭО между α -протонами соседних аминокислотных остатков. Это позволяет оценить максимальное межпротонное расстояние r_{max} , при котором в данных экспериментальных условиях наблюдаются кросс-пики ЯЭО, в 3,6–4,0 Å.

Определенную информацию о пространственной структуре DGA-вазопрессина дают, пожалуй, лишь наиболее интенсивные из локальных ЯЭО (рис. 2): ЯЭО между парами протонов $\text{C}_5^{\alpha}\text{H}-\text{N}_6\text{H}$ и $\text{C}_7^{\alpha}\text{H}-\text{N}_8\text{H}$ указывают на предпочтительность положительных значений углов внутреннего вращения ϕ остатков Asn^5 и Pro^7 . Кроме того, ЯЭО между $\text{C}_6^{\alpha}\text{H}$ и $\text{C}_7^{\alpha}\text{H}_2$ являются доказательством *транс*-конфигурации пептидной связи $\text{Cys}^6-\text{Pro}^7$ [1].

В полученном наборе данных ЯМР (табл. 1, рис. 2) лишь два факта позволяют существенно ограничить круг рассматриваемых структур пептидного остова молекулы: низкий температурный коэффициент $\Delta\delta/\Delta T$ для протона NH остатка Asn^5 и ЯЭО между α -протонами остатков Cys^4 и Cys^6 .

Слабая температурная зависимость химического сдвига протона NH остатка Asn^5 ($\Delta\delta/\Delta T=0,3 \cdot 10^{-3}$ м.д./К) указывает на экранирование этого протона от контакта с растворителем. Сходные температурные коэффициенты, полученные для NH остатка Asn^5 в окситоцине [9, 11], вазопрессине [11] и ряде аналогов нейрогипофизарных гормонов [15, 16], обычно объясняют участием этого протона во внутримолекулярной водородной связи. Именно этот факт, а также относительно низкое значение КССВ ${}^3J_{\text{HNC}}^{\alpha\text{H}}$ для остатка в положении 3 являются экспериментальным обоснованием предложенной Юрри и Вальтером [17] модели циклической части окситоцина — β -изгиб остова с угловыми остатками 3, 4 и внутримолекулярной водородной связью (Cys^2)CO...HN(Asn^5). Сопоставление данных рентгеноструктурного анализа и ЯМР-спектроскопии низкомолекулярных циклических пептидов [18] подтверждает правомерность подобной интерпретации. В работе [19] отмечалось, что β -изгиб остова экранирует амидный протон остатка $i+3$ от растворителя даже в отсутствие прочной водородной связи типа $4 \rightarrow 1$.

Альтернативные модели, объясняющие низкий температурный коэффициент NH остатка Asn^5 водородной связью с кислородом карбоксамидной группы Gln^4 или водородной связью типа $5 \rightarrow 1$ в остове, предложены Брюстером с соавт. [9]. Поскольку низкие значения $\Delta\delta/\Delta T$ для NH остатка Asn^5 сохраняются у ряда аналогов окситоцина, модифицированных в положении 4 [15, 16], экранирование амидного протона остатка Asn^5 боковой цепью Gln^4 представляется маловероятным. С другой стороны, расчетные оценки показали, что структуры, содержащие водородную связь (Cys^4)CO...HN(Asn^5), значительно уступают по конформационной энергии структурам с β -изгибом в положениях 3, 4. Таким образом, β -изгиб пептидного остова с угловыми остатками Phe^3 и Gln^4 — наиболее вероятное объяснение слабой температурной зависимости химического сдвига амидного протона остатка Asn^5 DGA-вазопрессина в диметилсульфоксиде.

Наличие дисульфидной связи предполагает пространственную близость остатков Cys¹ и Cys⁶. ЯЭО между α -протонами этих остатков не является, однако, неизбежным следствием такой близости: оценка расстояния C₁H ^{α} — C₆H ^{α} в различных стерически допустимых конформациях остова дает величины, колеблющиеся от 2,5 до 8 Å. Учитывая относительную интенсивность ЯЭО между этими протонами и полученную выше оценку предельного расстояния $r_{\text{макс}}$, следует предположить, что в конформационном равновесии DGA-вазопрессина высоким статическим весом обладают структуры, обеспечивающие сближение протонов C₁H ^{α} и C₆H ^{α} до расстояния менее 4 Å. Отметим, что ЯЭО между α -протонами цистеинов наблюдался также в окситоцине [20].

Таким образом, на основании данных ЯМР можно предполагать, что предпочтительная конформация или группа конформеров DGA-вазопрессина в диметилсульфоксиде обладает следующими характеристиками:

- 1) β -изгиб остова с угловыми остатками Phe³ и Gln⁴;
- 2) близкий контакт между α -протонами остатков Cys¹ и Cys⁶.

Предлагаемая модель пространственной организации молекулы должна также объяснить относительно низкий температурный коэффициент $\Delta\delta/\Delta T = 4,3 \cdot 10^{-3}$ м.д./К для амидного протона остова Gln⁴.

Теоретический конформационный анализ. Избранная методика конформационного анализа DGA-вазопрессина состояла в последовательном переходе от молекулярных фрагментов к все более детализированному представлению полной молекулы с минимизацией конформационной энергии и отбором низкоэнергетических конформаций, удовлетворяющих экспериментальным ограничениям (1) и (2). Расчет конформационной энергии проводился в попарно-аддитивном приближении с фиксированной валентной геометрией и плоскими *транс*-пептидными группами; использовались длины валентных связей, валентные углы и потенциалы атом-атомных взаимодействий, предложенные в работе [24]. Длина валентных связей C ^{α} —H принята равной 1,09 Å. На всех этапах расчета, за исключением последнего, группы CH и CH₂ боковых цепей учитывались как единые взаимодействующие центры [22]. Гуанидиновая группа аргинина и N-концевая аминогруппа считались ионизированными. Ниже приведены рассматривавшиеся модельные соединения и дана краткая характеристика основных этапов расчета.

1. *Ac-(Ala)₄-OMe.* Начальные конформации остова двух центральных остатков соответствовали β -изгибам I, II, III и III' (см. классификацию [23]), а концевых остатков — локальным минимумам конформационной энергии C, E, A и A* [24]. Минимизируемая целевая функция включала штрафной потенциал вида $U = U_0(R - R_0)^2$, стягивающий концевые метильные группы на расстоянии $R_0 = 5$ Å ($U_0 = 5$ ккал/моль). На этом этапе были отобраны 23 низкоэнергетические конформации ($E - E_{\text{мин}} \leq 7$ ккал/моль), удовлетворяющие «минимальным» критериям водородной связи типа 4→1 ($R_{\text{ОН}} \leq 3,5$ Å и $\theta_{\text{ОНН}} \leq 50^\circ$ [25]).

2. *H-(Ala)₆-OMe.* Для N-концевого остатка рассматривались три начальные конформации (C, E и A*), различающиеся значениями угла внутреннего вращения ψ ; для остатка 6, который в полной молекуле предшествует пролину, выбраны две стерически разрешенные стандартные конформации (E и A*). Ограничения, связанные с замыканием дисульфидной связи и контактом α -протонов, обеспечивались двумя слабыми штрафными потенциалами ($U_0 = 5$ ккал/моль), сближающими пары атомов C⁶ и H ^{α} остатков 1 и 6 на расстояния 4 и 3 Å соответственно.

3. *H-Cys-(Ala)₃-Cys-Pro-OMe.*

Пирролидиновое кольцо пролина фиксировалось в наиболее низкоэнергетической конформации «down» ($\varphi = -75^\circ$ [21]). Строгое замыкание дисульфидной связи обеспечивалось системой штрафных потенциалов [21]; оптимальные значения углов χ' остатков цистеина предварительно отбирались с помощью процедуры, описанной в работе [26]. По результатам минимизации конформационной энергии отобраны 9 структур пептидного

Низкоэнергетические конформации DGA-вазопрессина

Остаток	Углы	Условные обозначения структур				
		ВIII	ВIIIа	ВIII'	ВII	D
Cys ¹	φ	-62	-63	-54	-64	-72
	ψ	127	131	163	123	164
	χ ¹	180	-84	-59	171	70
Tyr ²	φ	-144	-147	-150	-154	-142
	ψ	170	177	151	168	-57
	χ ¹	-59	-60	49	-175	170
	χ ²	-80	-78	93	-109	-113
	χ ³	0	0	1	0	0
Phe ³	φ	-66	-62	48	-55	-84
	ψ	-29	-32	43	127	-32
	χ ¹	178	179	-84	176	-179
	χ ²	78	85	87	78	67
Gln ⁴	φ	-74	-67	54	63	-93
	ψ	-44	-46	42	30	159
	χ ¹	-70	-72	-62	-148	-55
	χ ²	87	87	91	-178	89
	χ ³	-3	-2	-95	-92	-7
Asn ⁵	φ	-153	-142	-153	-174	-85
	ψ	142	129	134	64	134
	χ ¹	58	55	176	-158	-175
	χ ²	90	92	62	-63	28
Cys ⁶	φ	-149	62	-103	-146	-160
	ψ	81	81	154	81	155
	χ ¹	-173	169	-54	-168	81
Pro ⁷	ψ	156	148	147	-22	145
Arg ⁸	φ	-154	-161	-159	-155	-166
	ψ	121	121	149	126	151
	χ ¹	-151	-149	40	-146	59
	χ ²	-178	179	179	179	-148
	χ ³	69	180	180	-178	-175
	χ ⁴	-95	83	-79	93	-80
$E-E_{мин}$, ккал/моль		3,9	2,7	0,0	9,4	5,0

остова циклической части молекулы, содержащих β-изгибы II, III и III'. Структуры, содержащие β-изгиб I, обладают относительной конформационной энергией $E-E_{мин} > 10$ ккал/моль. Учитывая опыт конформационных расчетов с использованием системы атом-атомных потенциалов [21], представляется маловероятным, что подобные стерические напряжения в остове циклической части молекулы могут быть компенсированы взаимодействиями с участием боковых цепей остатков 2-5. Поэтому структуры с конформационной энергией $E-E_{мин} > 10$ ккал/моль были исключены из дальнейшего рассмотрения.

4. $\overline{H-Cys-Tyr-Phe-Gln-Asn-Cys-Pro-O}Me$.

Для каждой из 9 структур остова методом, описанным в работе [26], отобрано несколько стерически ненапряженных конформаций боковых цепей и проведена минимизация конформационной энергии.

5. Отбор низкоэнергетических структур полной молекулы DGA-вазопрессина проводился в два этапа. Вначале систематически варьировались конформации С-концевой части молекулы, затем уточнялась конформационная энергия отдельных структур с учетом всех протонов боковых цепей.

Описанные выше расчеты базировались на двух существенных экспериментальных ограничениях и, следовательно, не гарантируют нахождение

Некоторые геометрические характеристики низкоэнергетических структур DGA-вазопрессина

Условные обозначения структур	Водородные связи				Межпротонные расстояния, Å										Область $^3J_{\text{HNC}\alpha\text{H}}$, Гц*					
	N _i H...O=C		N _i H...O=C Gln		$\text{C}_i^{\alpha}\text{H}-\text{N}_{i+1}\text{H}$										Phe ³	Gln ⁴	Asn ⁵	Cys ⁶	Arg ⁸	
	R _{ON} , Å	θ _{ONH} , град	R _{ON} , Å	θ _{ONH} , град	i															
	2	3	4	5	7	3	4	5	2,5	2,3	2,3	2,3	2,3	2,3	2,3	2,3	2,3	2,3	2,3	2,3
VIII	3,3	52	2,8	30	2,3	3,5	3,6	2,3	2,3	2,3	2,6	2,5	4,3	2,0-6,0	1,5-5,5	5,5-9,0	1,0-4,5	4,5-9,0		
VIIIa	3,2	50	2,8	26	5,2	3,6	3,6	2,3	2,3	2,3	2,7	2,6	4,3	3,0-7,5	2,0-6,0	6,5-8,5	7,0-8,5	6,0-10,0		
VIII'	2,7	39	2,9	76	2,4	2,8	2,8	2,3	2,2	2,2	2,9	2,8	4,2	5,0-9,0	7,0-10,5	5,0-9,5	2,0-6,0	4,5-9,0		
VII	2,8	35	-	-	2,4	2,2	3,0	2,6	3,5	4,6	2,6	2,6	2,6	5,5-10,0	7,0-8,5	7,5-11,0	6,0-10,0	4,0-8,5		
D	-	-	2,8	33	7,7	3,6	2,4	2,3	2,3	2,3	2,3	4,6	4,6	5,0-9,0	4,0-8,5	4,0-8,5	5,0-9,0	3,0-7,5		

* Область наиболее вероятных значений определена с учетом погрешностей зависимости $^3J_{\text{HNC}\alpha\text{H}}$ (r) [30] в предположении, что значения углов φ равномерно распределены в интервале φ ± 10°, где φ — величины, соответствующие минимумам конформационной энергии (табл. 2).

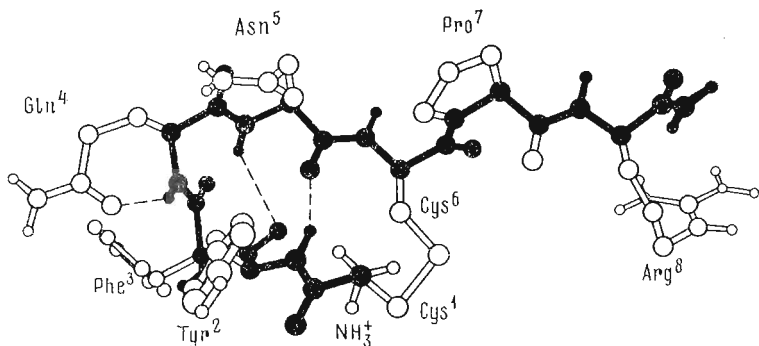


Рис. 3. Низкоэнергетическая конформация VIII, наиболее полно согласующаяся с данными ЯМР-спектроскопии DGA-вазопрессина в диметилсульфоксиде

полного набора низкоэнергетических конформаций DGA-вазопрессина. Поэтому весьма желательной представляется оценка конформационной энергии хотя бы нескольких стерически ненапряженных структур молекулы, не удовлетворяющих экспериментальным ограничениям. С этой целью проведен дополнительный расчет, включающий этапы 3–5 описанной выше схемы, для нескольких конформаций из набора низкоэнергетических структур [Arg⁸]вазопрессина, полученного в иной системе атомных потенциалов [27].

Сопоставление результатов теоретического конформационного анализа с данными ЯМР. Пептидный остов циклической части DGA-вазопрессина является наиболее жестким элементом пространственной структуры молекулы. Большинство рассмотренных низкоэнергетических структур циклической части молекулы допускает различные варианты пространственной укладки C-концевого дипептида Pro-Arg и боковых цепей остатков 2–5. Поэтому при сопоставлении результатов расчета с данными ЯМР будем считать существенно различными лишь те структуры DGA-вазопрессина, у которых конформации остова по крайней мере одного из остатков 1–6 принадлежат различным локальным минимумам типичной конформационной карты L-аминокислотных остатков [28, 29]. Оптимальные (соответствующие наименьшей для данного типа структуры конформационной энергии) величины углов внутреннего вращения ряда структур представлены в табл. 2, а характеристики, необходимые для сопоставления этих структур с данными ЯМР, — в табл. 3.

Полученные с учетом экспериментальных ограничений структуры VII, VIII и VIII' содержат β-изгиб пептидного остова с угловыми остатками Phe³-Gln⁴ и допускают близкий контакт между α-протонами остатков Cys¹ и Cys⁶. Структуры VII и VIII' характеризуются, кроме того, наличием водородной связи (Tyr²)CO...HN(Asn⁵). В структуре VIII расстояние O₂...N₅ (3,4 Å) и угол θ_{ОНН} (50°) превышают предельные значения, принятые в качестве критериев прочной водородной связи (3,2 Å и 35° [31]); в этом случае можно говорить лишь об очень слабой нелинейной водородной связи типа 4→1. Однако в структуре VIII (рис. 3) амидный протон Asn⁵ ориентирован внутрь β-изгиба и надежно экранирован от растворителя остовом молекулы и боковыми цепями остатков Tyr², Gln⁴ и Asn⁵.

Таким образом, характеристики, введенные в качестве ограничений на начальных этапах расчета, сохраняются при «свободной» минимизации конформационной энергии DGA-вазопрессина, причем две из трех полученных в результате минимизации структур (VIII и VIII') соответствуют наименьшим значениям энергии межатомных взаимодействий. Конформации, близкие к структурам VIII и VIII', содержатся также в наборе низкоэнергетических конформаций [Arg⁸]вазопрессина, описанном в монографии [27]. В дополнительном расчете, базировавшемся на остальных структурах этого набора, получены лишь две низкоэнергетические конформации DGA-вазопрессина (структуры VIIIa и D), одна из которых отличается от

структуры VIII конформацией остова Cys⁶ и дисульфидного мостика (что приводит к увеличению расстояния между α -протонами Cys¹ и Cys⁶). Хотя избранная схема расчета не гарантирует нахождения всех низкоэнергетических структур DGA-вазопрессина, существование конформаций, энергетически более выгодных в сравнении со структурами табл. 2, представляется маловероятным.

Сопоставим теперь некоторые характеристики структур табл. 2 с теми данными ЯМР, которые в расчетах не учитывались. Распределение расстояний между протонами C_i ^{α} H и N_{i+1}H в структурах VIII и VIII' вполне согласуется с распределением интенсивностей ЯЭО этого типа: максимальные ЯЭО соответствуют парам C₅ ^{α} H—N₆H и C₇ ^{α} H—N₈H. Обе структуры предсказывают также ЯЭО между амидными протонами соседних остатков в последовательности 3—5. В спектре NOESY (рис. 2) отчетливо наблюдается кросс-пик, соответствующий взаимодействию протонов NH остатков Phe³ и Gln⁴. Область пересечения близких резонансных частот протонов NH остатков Gln⁴ и Asn⁵ маскируется интенсивными диагональными пиками спектра NOESY, и вопрос о наличии или отсутствии ЯЭО между этими протонами остается открытым.

Конформационная подвижность боковых цепей остатков Tyr² и Phe³ в большинстве структур табл. 2 ограничена. Предпочтительным ротамером соответствует высокое значение одной из КССВ ³J_{HC ^{α} CH} и относительно низкое значение другой константы. Лишь для остатка Tyr² в структуре VIII' ожидаемые значения констант ³J_{HC ^{α} CH} отличаются от наблюдаемых в эксперименте.

В рамках структуры VIII легко объясняется относительно низкое значение температурного коэффициента $\Delta\delta/\Delta T$ амидного протона остатка Gln⁴: взаимная ориентация группы NH и боковой цепи Gln⁴ в положении $i+1$ β -изгиба III допускает образование водородной связи с участием амидного протона и кислорода карбоксамидной группы глутамина. Подобная водородная связь невозможна при положительных значениях угла ϕ Gln⁴, т. е. в случае β -изгибов II или III'.

Таким образом, структура, содержащая β -изгиб III (рис. 3), наиболее полно согласуется с данными ЯМР-спектроскопии. С другой стороны, относительно высокие значения $\Delta\delta/\Delta T$ для амидного протона Gln⁴ в окситоине [9, 11] более соответствуют модели, содержащей β -изгиб II, которая хорошо согласуется с количественными оценками ЯЭО [20] и недавно подтверждена рентгеноструктурными исследованиями [32].

Некоторые экспериментальные данные указывают на возможность существования минорных конформеров DGA-вазопрессина, в том числе конформеров, отличающихся от структур, описанных в табл. 2 и 3. Так, оптимальным значениям угла ϕ остатка $i+1$ в β -изгибе III соответствуют относительно низкие КССВ ³J_{HN ^{α} CH} (4—6 Гц). Более высокое экспериментальное значение ³J_{HN ^{α} CH} (7,4 Гц) для остатка Phe³ в DGA-вазопрессине может быть результатом конформационного усреднения. КССВ ³J_{HC ^{α} CH} остатков Cys¹ и Cys⁶ также указывают на отсутствие предпочтительных ротамеров по углам χ^1 . Наконец, в наиболее низкоэнергетических структурах табл. 2 амидные протоны остатков Asn⁵ и Cys⁶ удалены на расстояния, превышающие 4 Å. Более тесный контакт между этими протонами допускает лишь структура VII; в этом случае, однако, относительно удаленными друг от друга оказываются амидные протоны остатков Phe³ и Gln⁴. Наличие в спектре NOESY двух кросс-пиков, соответствующих парам амидных протонов остатков Phe³-Gln⁴ и Asn⁵-Cys⁶, также может свидетельствовать о равновесии нескольких конформеров DGA-вазопрессина. Сопоставление данных ¹H-ЯМР и теоретического конформационного анализа позволяет тем не менее предположить, что основной вклад в динамическое равновесие конформеров дают структуры, в которых пептидный остов образует β -изгиб III с угловыми остатками Phe³-Gln⁴ при относительно вытянутых участках Cys¹-Tyr² и Asn⁵-Cys⁶.

Экспериментальная часть

Синтез des-Gly⁹-[Arg⁸]вазопрессина описан в работе [33]. Одномерные и двумерные спектры ¹H-ЯМР получены на спектрометре WM-360 (Bruker) с рабочей частотой 360 МГц в 5-мм ампуле при 35° С; 0,002 М раствор DGA-вазопрессина в диметилсульфоксиде был приготовлен после лиофилизации пептида из водного раствора с pH 6,5. Химические сдвиги определены с точностью ±0,01 м.д. относительно внутреннего стандарта гексаметилдисилоксана (δ 0,055 м.д.), а КССВ — с точностью ±0,3 Гц. Температурные коэффициенты химических сдвигов сигналов измерены в диапазоне 30–60° С.

Спектры COSY получены с помощью последовательности 90-градусных импульсов [34]:

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

для 512 эквидистантных значений t_1 с шагом 0,1 мс и числом накоплений $n=32$. Задержка между сериями импульсов составляла 2 с. Для уменьшения аксиальных сигналов и артефактов квадратичного детектирования применялись 16-фазовые циклы 90-градусных импульсов [34]. Матрица данных во временной области дополнялась нулями таким образом, чтобы после преобразования Фурье была получена матрица 1024×1024 точек со спектральным разрешением 4,9 Гц на точку в обоих направлениях. Перед преобразованием Фурье матрицу данных умножали на функции $\sin^k[\pi(t+t_0)/t_s]$ в направлении t_k ($k=1, 2$), причем значения t_s выбирались таким образом, чтобы эти функции принимали нулевые значения в последних экспериментальных точках, а фазовые сдвиги в направлениях t_1 и t_2 были равны $1/64$ и $1/16$ соответственно. Матрица данных частотного представления была симметризована [35].

Спектры NOESY получены импульсной последовательностью [34]:

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

со временем смешивания $\tau_M=0,6$ с. Остальные параметры накопления и обработки те же, что для спектров COSY.

ЛИТЕРАТУРА

1. Быстров В. Ф. Биоорган. химия, 1984, т. 10, № 8, с. 997–1043.
2. Nagayama K., Wüthrich K. Eur. J. Biochem., 1981, v. 114, № 2, p. 365–374.
3. Wagner G., Kumar A., Wüthrich K. Eur. J. Biochem., 1981, v. 114, № 2, p. 375–384.
4. Wagner G., Wüthrich K. J. Mol. Biol., 1982, v. 155, № 3, p. 347–366.
5. Williamson M. P., Marion D., Wüthrich K. J. Mol. Biol., 1984, v. 173, № 3, p. 341–359.
6. Арсеньев А. С., Кондаков В. И., Майоров В. Н., Волкова Т. М., Гришин Е. В., Быстров В. Ф., Овчинников Ю. А. Биоорган. химия, 1983, т. 9, № 6, с. 768–793.
7. Glickson J. D. In: Peptides: chemistry, structure, biology/Eds Walter R., Meienhofer J. Ann Arbor: Ann Arbor Sci., 1975, p. 787–802.
8. Wüthrich K. NMR in biological research: peptides and proteins. Amsterdam: North-Holland Publishing Company, 1976.
9. Brewster A. I. R., Hruby V. J., Glasel J. A., Tonelli A. E. Biochemistry, 1973, v. 12, № 26, p. 5294–5304.
10. Billeter M., Braun W., Wüthrich K. J. Mol. Biol., 1982, v. 155, № 3, p. 321–346.
11. Walter R., Glickson J. D., Schwartz I. L., Havran R. T., Meienhofer J., Urry D. W. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1972, v. 68, № 7, p. 1920–1924.
12. Braun W., Bösch C., Brown L. R. Gö N., Wüthrich K. Biochim. et biophys. acta, 1981, v. 667, № 2, p. 377–396.
13. Keepers J. W., James T. L. J. Magn. Reson., 1984, v. 57, № 3, p. 404–426.
14. Shenderovich M. D., Nikiforovich G. V., Chipens G. I. J. Magn. Reson., 1984, v. 59, № 1, p. 1–12.
15. Walter R., Wyssbrod H. R., Glickson J. D. J. Amer. Chem. Soc., 1977, v. 99, № 22, p. 7326–7332.
16. Ballardini A., Fischman A. J., Gibbons W. A., Roy J., Schwartz I. L., Smith C. W., Walter R. Biochemistry, 1978, v. 17, № 21, p. 4443–4454.
17. Urry D. W., Walter R. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1971, v. 68, № 5, p. 956–958.
18. Gierach L. M., Dever C. M., Madison V., Niu C.-H., Blout E. R. Biochemistry, 1981, v. 20, № 16, p. 4730–4738.
19. Némethy G., Scheraga H. A. Biochem. and Biophys. Res. Commun., 1980, v. 95, № 1, p. 320–327.

20. Ford J. J., Gibbons W. A. In: Peptides. Structure and biological function/Eds Gross E., Meienhofer J. Rockford, Illinois: Pierce Chemical Company, 1979, p. 857-859.
21. Momany F. A., McGuire R. F., Burgess A. W., Scheraga H. A. J. Phys. Chem., 1975, v. 79, № 22, p. 2361-2381.
22. Dunfield L. G., Burgess A. W., Scheraga H. A. J. Phys. Chem., 1978, v. 82, № 24, p. 2609-2616.
23. Lewis P. N., Momany F. A., Scheraga H. A. Biochim. et biophys. acta, 1973, v. 303, № 2, p. 211-229.
24. Zimmermann S. S., Scheraga H. A. Biopolymers, 1977, v. 16, № 4, p. 811-843.
25. Виноградов С. В. в кн.: Молекулярные взаимодействия. М.: Мир, 1984, с. 212.
26. Никифорович Г. В., Шендерович М. Д., Балодис Ю. Ю. Биоорган. химия, 1981, т. 7, № 2, с. 179-188.
27. Никифорович Г. В., Галактионов С. Г., Чуненс Г. И. Конформации пептидных биорегуляторов. М.: Медицина, 1983.
28. Балодис Ю. Ю., Вегнер Р. Э., Никифорович Г. В., Чуненс Г. И. Биоорган. химия, 1978, т. 4, № 4, с. 481-488.
29. Lewis P. N., Momany F. A., Scheraga H. A. Isr. J. Chem., 1973, v. 11, № 2-3, p. 121-152.
30. Bystrov V. F., Ivanov V. T., Portnova S. L., Balashova T. A., Ovchinnikov Yu. A. Tetrahedron, 1973, v. 29, № 6, p. 873-877.
31. Chandrasekaran R., Lakshminarayanan A. V., Pandya U. V., Ramachandran G. N. Biochim. et biophys. acta, 1973, v. 303, № 1, p. 14-27.
32. Blundell T. L., Cooper S., Li J.-Y., Pitts J. E., Tickle I. J., Terchharne A. C., Wodd S. P., Hruby V. J., Wyssbrod H. R. Acta crystallogr., 1984, v. 40, suppl., p. C-39.
33. Пансүевич О. С., Чуненс Г. И. Ж. общ. химии, 1970, т. 40, № 3, с. 709-710.
34. Wider G., Macura S., Kumar A., Ernst R. R., Wüthrich K. J. Magn. Reson., 1984, v. 56, № 2, p. 207-234.
35. Baumann R., Kumar A., Ernst R. R., Wüthrich K. J. Magn. Reson., 1981, v. 44, № 1, p. 76-83.

Поступила в редакцию

4.II.1985

После доработки

2.IV.1985

A STUDY ON THE SPATIAL STRUCTURE OF des-Gly⁹-[Arg⁸]VASOPRESSIN BY TWO-DIMENSIONAL NMR SPECTROSCOPY AND THEORETICAL CONFORMATIONAL ANALYSIS

SHENDEROVICH M. D., SEKACIS I. P., LIEPINSH E. E.,
NIKIFOROVICH G. V., PAPSUEVICH O. S.

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

2D ¹H-NMR spectra of des-Gly⁹-[Arg⁸]vasopressin in dimethylsulfoxide have been taken and the ¹H resonances have been assigned. The coupling constants and amide proton temperature coefficients ($\Delta\delta/\Delta T$) have been measured and the NOE cross-peaks in the NOESY spectrum have been analyzed. The most essential information on the spatial structure of des-Gly⁹-[Arg⁸]vasopressin is extracted from the low $\Delta\delta/\Delta T$ value for Asn⁵ amide proton and from the NOE between the Cys¹ and Cys⁶ α -protons. A diminished accessibility of the Asn⁵ NH proton for the solvent is ascribed to the presence of a β -turn in the fragment 2-5. The distance between the Cys¹ and Cys⁶ C α H protons seems to be less than 4 Å. These constraints were taken into account in the conformational analysis of the title peptide. The derived set of the low-energy backbone conformations was analyzed against the background of the all available NMR data. The most probable conformation of the cyclic moiety in des-Gly⁹-[Arg⁸]vasopressin was found to be the type III β -turn. The corner positions are occupied by the residues 3, 4, while the residues 1-2 and 5-6 are at the extended sites. Some NMR data indicate that this structure is in a dynamic equilibrium with other minor conformers.