



УДК 577.175.853'17.012.6:577.322.5:543.422.25

ИНТЕРПРЕТАЦИЯ СПЕКТРОВ ¹H-ЯМР ЦИКЛИЧЕСКОГО АНАЛОГА КАЛЛИДИНА В РАСТВОРАХ

Саулитис Ю. Б., Лиетиньш Э. Э., Мутулис Ф. К., Чинис Г. И.

Институт органического синтеза Академии наук ЛатвССР, Рига

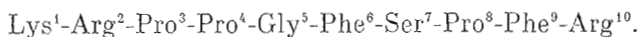
Совместным анализом двумерных COSY- и NOESY-спектров выполнено отнесение сигналов в спектрах ¹H-ЯМР [цикло(10→1^ε)]каллидина (цикло-КЛ) в растворе (CD₃)₂SO и H₂O. В растворе (CD₃)₂SO присутствуют медленно обменивающиеся конформеры цикло-КЛ I, цикло-КЛ II, цикло-КЛ III, содержание которых 25, 35, 40%.

Конформер цикло-КЛ I характеризуется *транс*-конфигурацией всех пептидных связей, а цикло-КЛ II и цикло-КЛ III имеют *цис*-конфигурации пептидных связей Pro³-Pro² и Arg²-Pro³ соответственно.

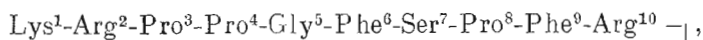
Показано, что в растворе (CD₃)₂SO происходит следующий обмен между конформерами: цикло-КЛ II ⇌ цикло-КЛ I ⇌ цикло-КЛ III. Методом титрования диметилсульфоксидом сделано отнесение сигналов ¹H-ЯМР всех трех конформеров цикло-КЛ в H₂O, где их содержание составляет 45, 25, 30%.

Пространственные структуры молекулы пептидного биорегулятора брадикинина и его природных аналогов из класса кининов в растворе привлекают внимание многих исследователей [1, 2]. Это вызвано важной ролью кининов в локальной регуляции биохимических и физиологических реакций организма [2].

По биологической значимости брадикинину не уступает другой представитель класса кининов — лизил-брадикинин, или каллидин, с аминокислотной последовательностью [1]



Экспериментальные исследования пространственной структуры каллидина в растворе до сих пор, по-видимому, не проводились. Недавно в Институте органического синтеза АН ЛатвССР синтезирован циклический аналог каллидина [цикло(10→1^ε)]каллидин (цикло-КЛ)



обладающий высокой, более специфичной по сравнению с брадикинином биологической активностью [3]. Конформационная подвижность цикло-КЛ ограничена вследствие циклизации молекулы. Это обстоятельство в связи с биологической активностью цикло-КЛ определяет интерес к его пространственной структуре в растворе. Поэтому мы начали изучение методами двумерной (2D) спектроскопии ¹H-ЯМР пространственной структуры цикло-КЛ в растворах (CD₃)₂SO и H₂O. В настоящей работе представлен первый этап этого исследования — отнесение сигналов протонов и описание *цис-транс*-изомеризации связей Хаа-Pro.

Отнесение сигналов ЯМР протонов цикло-КЛ началось с анализа спектра, коррелированного по скалярному спин-спиновому взаимодействию COSY-спектра, т. е. с выделением спиновых систем протонов, соответствующих отдельным аминокислотным остаткам. В COSY-спектрах декапептида цикло-КЛ наблюдается 30 таких систем. Наличие трех наборов различных по интенсивности сигналов протонов указывает на существование в шкале времени ЯМР трех конформеров. После полного анализа COSY-спектров цикло-КЛ выделены спиновые системы протонов, соответствующие трем остаткам Lys, шести — Arg, девяти — Pro, трем — Gly, трем — Ser, шести — Phe (рис. 1).

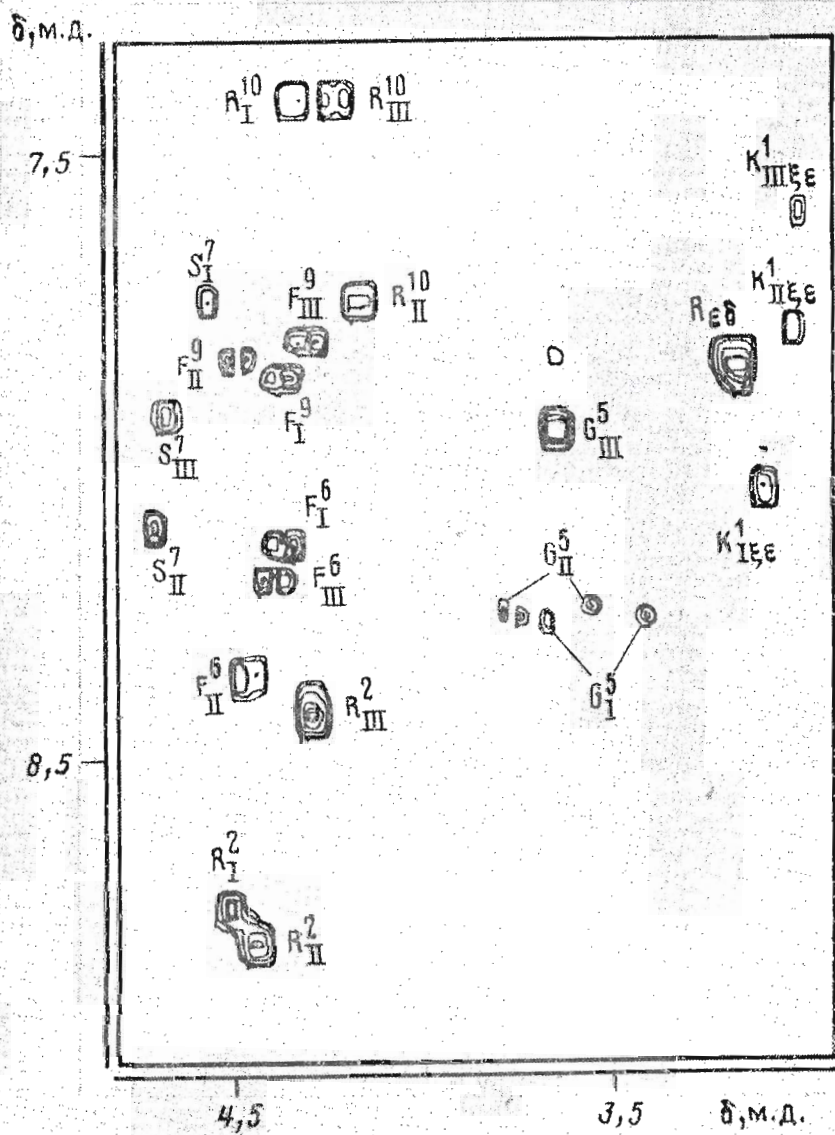


Рис. 1. Область COSY-спектра: δ_1 7,3–9,0 м.д., δ_2 2,9–4,8 м.д. Кросс-пики указывают на КССВ между протонами NH – C $^{\alpha}$ H, C $^{\alpha}$ H – N $^{\beta}$ H, C $^{\alpha}$ H – N $^{\delta}$ H. Здесь и далее использован однобуквенный код для обозначения аминокислотных остатков (K – Lys, R – Arg, P – Pro, F – Phe, S – Ser, G – Gly), а нижние индексы I–III указывают изомер цикло-КЛ I, цикло-КЛ II, цикло-КЛ III

Далее для отнесения сигналов к определенному положению аминокислотных остатков в первичной структуре цикло-КЛ использовали NOESY-спектры. Отнесение начиналось анализом $d_{\alpha\text{N}^-}$, d_{NN^-} и $d_{\beta\text{N}^-}$ связей [4], отвечающих ядерному эффекту Оверхаузера (ЯЭО) между протонами NH данного остатка и протонами C $^{\alpha}$ H, NH и C $^{\beta}$ H предыдущего остатка. По $d_{\alpha\text{N}^-}$ и d_{NN^-} связям (рис. 2, 3) для каждого из трех конформеров выделены три фрагмента: Lys 1 -Arg 2 , Pro 4 -Gly 5 -Phe 6 -Ser 7 и Pro 8 -Phe 9 -Arg 10 . Однако отсутствие протонов NH в остатках пролина препятствует окончательному отнесению.

Естественно предположить, что наличие конформеров в спектрах ЯМР вызвано *цис-транс*-изомеризацией цикло-КЛ по пептидным связям Хаа-Pro. Это предположение удалось обосновать при анализе NOESY-спектров. Для выделения сигналов, соответствующих отдельным конформерам, нами

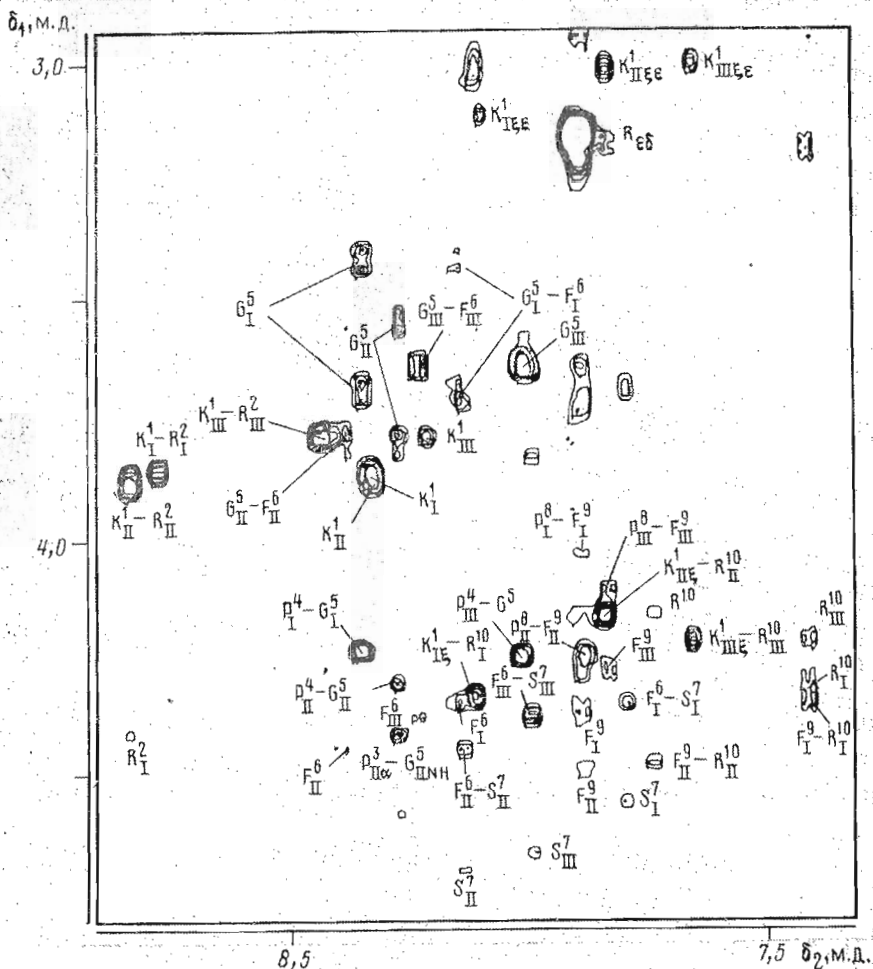


Рис. 2. Область фазоизбирательного NOESY-спектра: δ_1 , 2,9–4,8 м.д., δ_2 , 7,3–8,9 м.д., $\tau_m=0,3$ с, 303 К. Здесь и далее в NOESY-спектрах представлены контуры отрицательных уровней. Показаны $d_{\alpha N}$ -связи и ЯЭО между протонами NH – $C^\alpha H$ аминокислотного остатка

использованы обменные кросс-пики, соответствующие реакции *цис-транс*-изомеризации.

В NOESY-спектре (рис. 3) при времени обмена компонент намагниченности $\tau_m=0,3$ с и 303 К наблюдаются обменные кросс-пики между сигналами протонов двух изомеров, которые условно обозначены цикло-КЛ I и цикло-КЛ II. При данных условиях обменные кросс-пики между сигналами протонов третьего изомера цикло-КЛ III и сигналами цикло-КЛ I или цикло-КЛ II отсутствуют, а наблюдаемые кросс-пики по интенсивности трудно отличимы от кросс-пиков ЯЭО. Для точного отнесения обменных кросс-пиков получен NOESY-спектр 323К ($\tau_m=0,3$ с).

При повышении температуры обменные кросс-пики в NOESY-спектре становятся более интенсивными (рис. 4) вследствие увеличения скорости обмена, а интенсивность кросс-пиков ЯЭО падает из-за уменьшения времени корреляции молекулярного движения τ_c . Таким образом, при 323К удалось четко выделить обменные кросс-пики. Далее, контролируя изменение химических сдвигов протонов от температуры съемкой COSY-спектров, осуществили отнесение сигналов всех протонов в цикло-КЛ III при 303К (табл. 1).

Наличие в NOESY-спектре ЯЭО между протонами $C^\alpha H$ Arg² – $C^\alpha H$ Pro³ (рис. 5) указывает на *цис*-конфигурации пептидной связи Arg²-Pro³, а ЯЭО между $C^\alpha H$ Pro³ – $C^\delta H$ Pro⁴ и $C^\alpha H$ Ser⁷ – $C^\delta H$ Pro⁸ – на *транс*-кон-

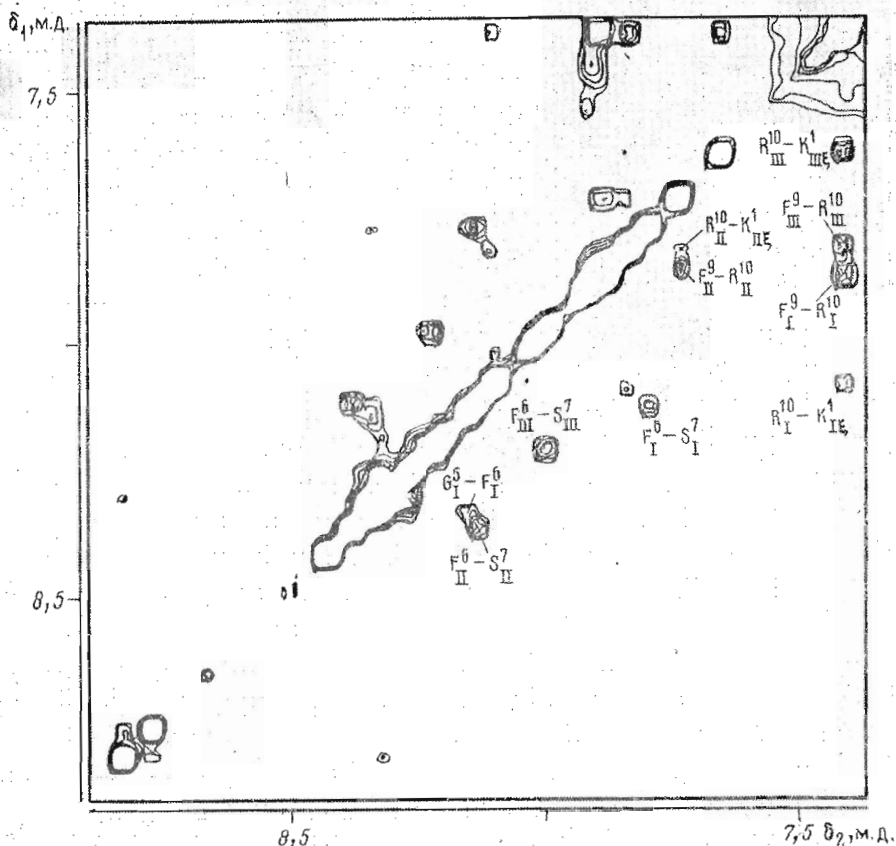


Рис. 3. Область фазоизбирательного NOESY-спектра: δ_1, δ_2 7,3–8,9 м.д., $\tau_m=0,3$ с, 303 К. Показаны отнесения d_{NN} -связей, включая участие протонов N^H Lys¹ (отмечены индексом ξ)

фигурацию пептидных связей Pro³-Pro⁴ и Ser⁷-Pro⁸. Следовательно, изомер цикло-КЛ III характеризуется *cis*-конфигурацией связи Arg²-Pro⁴, а остальные пептидные связи имеют *trans*-конфигурацию. В NOESY-спектре (рис. 5) цикло-КЛ III наблюдаются три ЯЭО между протонами, не принадлежащими к соседним по аминокислотной последовательности остаткам C^αH Pro⁴ – C^αH Pro⁸, C^αH Arg² – C^αH Pro⁸ и C^αH Pro³ – NH Gly⁵. Эти сигналы нельзя отнести к кросс-пикам, соответствующим *cis-trans*-переходам Хаа-Pro. Они не могут соответствовать также межмолекулярным ЯЭО, связанным с ассоциацией пептидных молекул. Об этом свидетельствует изучение концентрационной зависимости спектров ЯМР, поскольку изменение концентрации (от 0,12 до 0,005 М) не меняло значения химических сдвигов сигналов. Эти ЯЭО позволяют объединить группы сигналов протонов, относящихся к изомерам цикло-КЛ I и цикло-КЛ II. ЯЭО между протонами C^αH Pro⁴ – C^αH Pro⁸ позволяет объединить сигналы протонов в аминокислотной последовательности фрагмента Pro⁴ – Arg¹⁰ одного изомера (предположим, что это цикло-КЛ I). Далее ЯЭО между протонами C^αH Arg² – C^αH Pro⁸ позволяет отнести сигналы протонов аминокислотных остатков Lys¹-Arg² и фрагмента Pro⁴-Arg¹⁰ ко второму изомеру – цикло-КЛ II, а оставшиеся сигналы протонов остатков Lys¹-Arg² – к изомеру цикло-КЛ I.

Для изомера цикло-КЛ II наблюдается ЯЭО между протонами C^αH Pro³ – C^αH Pro⁴, наличие которого одновременно позволяет различить сигналы протонов C^αH остатка Pro³ в изомерах цикло-КЛ I, цикло-КЛ II и свидетельствует о *cis*-конфигурации пептидной связи Pro³-Pro⁴ в цикло-КЛ II.

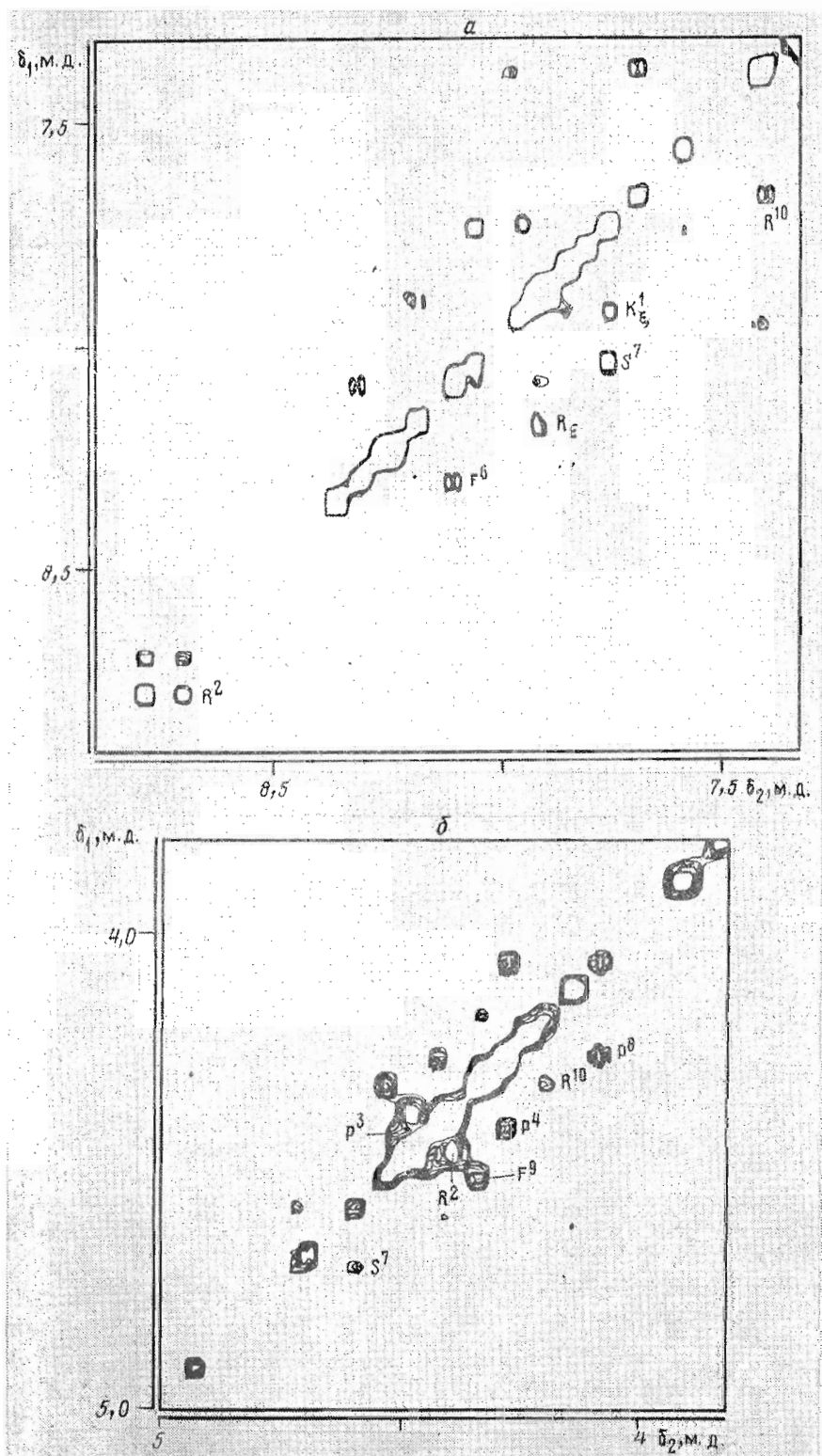


Рис. 4. Области фазоизбирательного NOESY-спектра: *a* – δ_1, δ_2 7,3–8,9 м.д., *б* – δ_1, δ_2 3,8–5,0 м.д., $\tau_m=0,3$ с, 323 К. Показаны отнесения обменных кросс-пиков между сигналами NH (*a*) и C^αH (*б*) протонов изомеров цикло-КЛ I и цикло-КЛ II

Параметры спектров ^1H -ЯМР цикло-КЛ III в $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$ и H_2O при 303 К

Аминоглю- т- ный остаток	δ , м. д.										$\Delta\delta_{\text{NH}}/\Delta T \cdot 10^4$, м. д./К	$^2J_{\text{HNC}\alpha\text{H}}$, Гц ($\text{CD}_3)_2\text{SO}$
	NH		C^αH		C^βH		Другие протоны					
	($\text{CD}_3)_2\text{SO}$	H_2O	($\text{CD}_3)_2\text{SO}$	H_2O	($\text{CD}_3)_2\text{SO}$	H_2O	($\text{CD}_3)_2\text{SO}$	H_2O	($\text{CD}_3)_2\text{SO}$	H_2O		
Lys ¹	<i>a</i>		3,77	3,71	1,64	2,07	C^βH 2,97; 2,97	C^βH 3,18; 3,18	4,4 ^e	4,8 ^e		
Arg ²	8,43	8,11	4,27	4,22	1,46	1,72	N^βH 7,75	N^βH 7,75	2,8	6,7	8,8	
Pro ³			4,93	4,89	1,46	1,72						
Pro ⁴			4,24	4,38	2,32	2,47						
					2,01	2,13						
					2,11	2,06	C^γH 1,71; 1,62					
					1,72	2,63	C^δH 3,74; 3,51					
Gly ⁵	8,01	8,10	3,63	3,81					3,2	4,8		
			3,63	3,81								
Phe ⁶	8,23	8,17	4,37	4,60	3,08	3,14			2,4	4,7	8,8	
					2,70	2,95						
Ser ⁷	7,98	7,90	4,66	4,68	3,83	4,01	OH 5,87		4,6	5,5	6,8	
					3,64	3,69						
Pro ⁸			4,10	4,10	1,96	1,92	C^γH 1,70; 1,70					
					1,36	1,40	C^δH 3,76; 3,57					
Phe ⁹	7,83	7,73	4,27	4,53	3,18	3,14			1,6	5,0	7,8	
					2,90	3,02						
Arg ¹⁰	7,39	7,70	4,21	4,31	1,62	1,71			0,9	4,3	8,8	
					1,62	1,71						

Здесь и в следующих таблицах:

^a Сигналы протонов $\alpha\text{-NH}_2$ остатка Lys¹ не удалось наблюдать из-за сильного уширения вследствие быстрого обмена с протонами остаточной H_2O в $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$.

^b Не указанные сигналы протонов боковых цепей не удалось однозначно отнести из-за перекрытия сигналов протонов в COSY-спектрах.

^c Температурные коэффициенты N^βH -протонов остатка Lys¹.

^d Химические сдвиги сигналов протонов C^βH и N^βH остатков Arg во всех изомерах мало отличаются и имеют значения $\sim 3,18$ и $\sim 7,18$ м. д.

Отнесение сигналов протонов остатка Pro³ подтверждается также наличием ЯЭО между протонами C^αH Pro³ — NH Gly⁵ в изомере цикло-КЛ II (рис. 2). Остальные пептидные связи Хаа-Pro в обоих изомерах имеют *транс*-конфигурацию; на это указывают ЯЭО между протонами C^αH Pro³ — C^βH Pro⁴ в изомере цикло-КЛ I и ЯЭО C^αH Arg² — C^βH Pro³, C^αH Ser⁷ — C^βH Pro⁸ в обоих изомерах. Эти ЯЭО позволили выявить также сигналы соответствующих протонов C^δH Pro, а затем из COSY-спектров и сигналы протонов C^γH Pro (табл. 1–3).

Таким образом, анализ NOESY-спектров позволил провести отнесение сигналов протонов в изомерах цикло-КЛ I и цикло-КЛ II (табл. 2, 3). Обменные кросс-пики в NOESY-спектрах свидетельствуют о конформационных переходах между этими изомерами. Из NOESY-спектров, полученных при разных температурах по интенсивностям обменных кросс-пииков, можно оценить константу скорости обмена аналогично, как это сделано в работе [5], а далее из уравнения Эйринга вычислить свободную энергию активации $\Delta G_{\tau}^{\ddagger}$ для процесса обмена. Для *цис-транс*-изомеризации связи Pro³-Pro⁴ в цикло-КЛ величина $\Delta G_{303\text{K}}^{\ddagger}$ составляет 73,2 кДж/моль · К.

Естественно предположить, что между сигналами протонов изомеров цикло-КЛ I и цикло-КЛ III также должны наблюдаться обменные кросс-

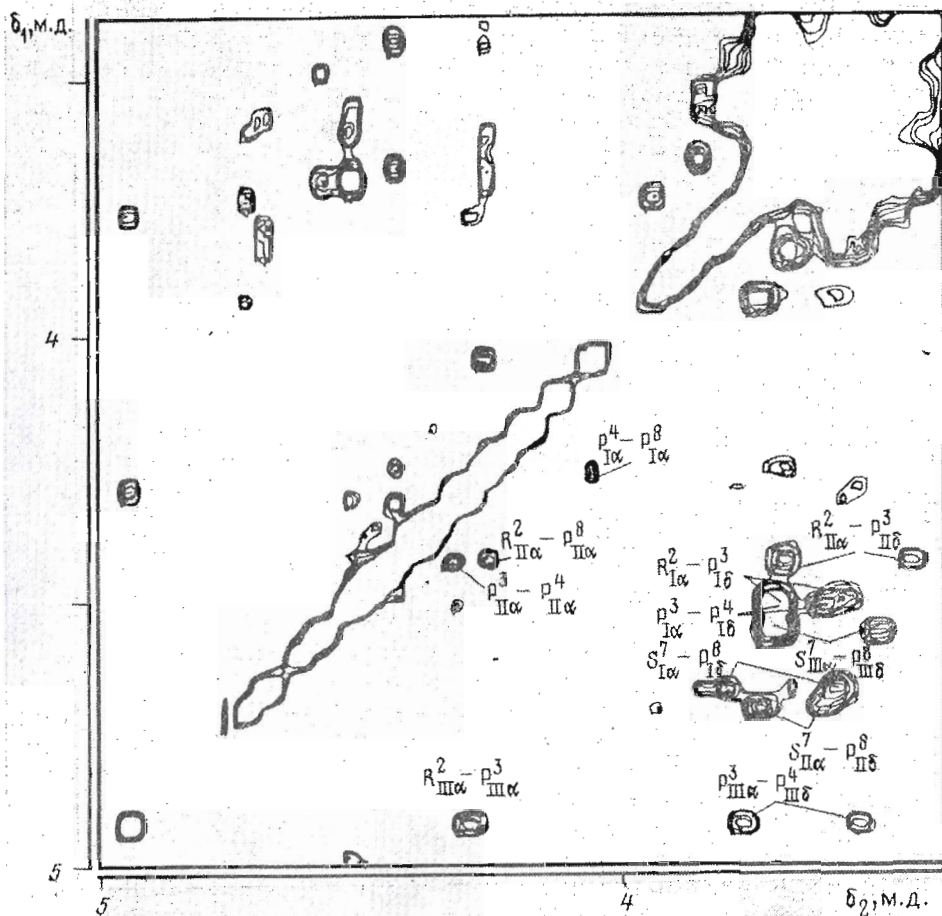


Рис. 5. Область фазонизбирательного NOESY-спектра: δ_1, δ_2 3,3–5,0 м.д., $\tau_m=0,3$ с, 303 К. Показаны ЯЭО между протонами $C^{\alpha}H$ Хаа – $C^{\alpha}H$ Про и $C^{\alpha}H$ Хаа – $C^{\beta}H$ Про, указывающие на *цис-транс*-конфигурацию пептидных связей Хаа-Про, а также между протонами $C^{\alpha}H$, не принадлежащими соседним по аминокислотной последовательности остаткам

пики, поскольку должна происходить *цис-транс*-изомеризация по пептидной связи Arg^2-Pro^3 . Однако в NOESY-спектрах (рис. 4) при 323К и $\tau_m=0,3$ с не наблюдаются обменные кросс-пики, соответствующие этому процессу, что может быть объяснено более высокой энергией активации ΔG_{\ddagger} и, следовательно, более низкой константой скорости. Константу скорости обмена можно увеличить, повышая температуру. Действительно, в NOESY-спектре при 353К (рис. 6) наблюдаются интенсивные обменные кросс-пики между сигналами NH протонов остатков Arg^2 изомеров цикло-КЛ I и цикло-КЛ III. Наличие переходов между этими конформерами удалось показать также классическим методом переноса насыщения, который полезен для наблюдения медленного в шкале времени ЯМР обмена. При насыщении сигнала NH-протонов остатка Arg^2 изомера цикло-КЛ III наблюдалось изменение интенсивности сигнала протонов Arg^2 изомера цикло-КЛ I (рис. 7). Эти результаты доказывают существование обмена между изомерами цикло-КЛ I и цикло-КЛ III. Величина $\Delta G_{353K}^{\ddagger}$, оцененная по интенсивности обменных кросс-пигов, составляет $\sim 81,6$ кДж/моль·К. По интегральным интенсивностям в одномерных 1H -ЯМР-спектрах цикло-КЛ I оценено содержание изомеров цикло-КЛ I 25%, цикло-КЛ II 35% и цикло-КЛ III 40%.

Таким образом, в растворе $(CD_3)_2SO$ показано наличие трех *цис-транс*-изомеров, обменивающихся между собой следующим образом:

Параметры спектров ^1H -ЯМР цикло-КЛ I в $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$ и H_2O (pH 3,95) при 303 К

Аминокислотный остаток	δ , м. д.								$\Delta\delta_{\text{NH}}/\Delta T \cdot 10^3$, м. д./К		$^3J_{\text{NH}^{\alpha}\text{H}}$, Гц ($(\text{CD}_3)_2\text{SO}$)
	NH		$\text{C}^{\alpha}\text{H}$		C^{β}H		Другие протоны		$(\text{CD}_3)_2\text{SO}$	H_2O	
	$(\text{CD}_3)_2\text{SO}$	H_2O	$(\text{CD}_3)_2\text{SO}$	H_2O	$(\text{CD}_3)_2\text{SO}$	H_2O	$(\text{CD}_3)_2\text{SO}$	H_2O			
Lys ¹	<i>a</i>		3,85	3,79	1,69;	1,98	$\text{C}^{\alpha}\text{H}$ 1,38; 1,38	$\text{C}^{\alpha}\text{H}$ 3,24	5,1 °	5,0 °	
Arg ²	8,77	8,69	4,51	4,58	1,61;	1,76	$\text{C}^{\alpha}\text{H}$ 2,97; 2,97	N^{β}H 7,96	3,2	5,7	6,8
Pro ³			4,50	4,63	2,22;	2,39	$\text{C}^{\gamma}\text{H}$ 1,86; 1,86	N^{β}H 8,10 <i>б, з</i>			
Pro ⁴			4,23	4,23	2,04;	2,15	$\text{C}^{\gamma}\text{H}$ 1,83; 1,83	$\text{C}^{\alpha}\text{H}$ 3,18 $\text{N}^{\alpha}\text{H}$ 7,17			
Gly ⁵	8,33	8,42	3,66	3,90					5,2	4,7	6,8
Phe ⁶	8,14	8,11	3,42	3,70	3,14;	3,18			2,9	5,3	8,8
Ser ⁷	7,78	7,78	4,36	4,57	2,89	3,04					
Pro ⁸			4,56	4,69	3,67;	3,90	ОН 5,57		3,1	5,2	6,8
			4,02	4,01	3,67	3,69					
					1,90;	1,85	$\text{C}^{\gamma}\text{H}$ 1,86; 1,85				
					1,18	1,23	$\text{C}^{\alpha}\text{H}$ 3,68; 3,47				
Phe ⁹	7,88	7,69	4,39	4,60	2,97;	3,18			4,4	4,7	8,9
Arg ¹⁰	7,40	7,65	4,35	4,29	2,83	2,94					
					1,72;	1,48			1,2	2,7	8,8
					1,72	1,48					

а, б, в, з См. табл. 1.

цикло-КЛ II \rightleftharpoons цикло-КЛ I \rightleftharpoons цикло-КЛ III. Изомер цикло-КЛ I характеризуется *транс*-конfigurацией всех пептидных связей. В изомере цикло-КЛ II пептидная связь Pro³-Pro⁴ имеет *цис*-конfigurацию, а изомер цикло-КЛ III характеризуется *цис*-конfigurацией связи Arg²-Pro³. Проведено также отнесение сигналов протонов всех изомеров цикло-КЛ (табл. 1–3).

Вследствие большого числа сигналов, взаимное расположение которых в спектре ^1H -ЯМР меняется с изменением температуры, измерение температурных коэффициентов химических сдвигов сигналов амидных протонов является в данном случае сложной задачей. Для ее решения потребовалось уточнение отнесения сигналов протонов при каждом значении температуры с использованием COSY-спектров. С помощью фазоизбирательного COSY-спектра (рис. 8), как описано ранее [6], измерены также $\text{KCCB } ^3J_{\text{NH}^{\alpha}\text{H}}$, величины которых приведены в табл. 1–3. Интерпретация сигналов ^1H -ЯМР всех трех конформеров цикло-КЛ проведена также в водном растворе. В COSY-спектрах были идентифицированы спиновые системы всех аминокислотных остатков. Затем постепенным титрованием раствора цикло-КЛ в H_2O диметилсульфоксидом и анализом изменений химических сдвигов сигналов выполнено отнесение спиновых систем к конкретным аминокислотным остаткам в аминокислотной последовательности (табл. 1–3). Из COSY-спектров цикло-КЛ в H_2O при разных температурах измерены температурные коэффициенты амидных протонов $\Delta\delta_{\text{NH}}/\Delta T$ (табл. 1–3). В дальнейшем, используя полученные

Параметры спектров ¹H-ЯМР цикло-КЛ II в (CD₃)₂SO и H₂O (pH 3,95) при 303 К

АМИНОКЛОТ- НЫЙ ОСТАТОК	δ, м. д.								Δδ _{NHII} /ΔT · 10 ³ , м. д./К		¹ J _{HNCαH} , Гц (CD ₃) ₂ SO
	NH		CαH		CβH		Другие протоны		(CD ₃) ₂ SO	H ₂ O	
	(CD ₃) ₂ SO	H ₂ O	(CD ₃) ₂ SO	H ₂ O	(CD ₃) ₂ SO	H ₂ O	(CD ₃) ₂ SO	H ₂ O			
Lys ¹	a		3,87	3,82	1,73; 1,73	2,07; 2,07	C ^δ H 1,35; 1,35 C ^ε H 2,98; 2,98 N ^ε H 7,83	C ^ε H 3,20 3,20 N ^ε H 7,94	5,8 ^a	6,4 ^a	
Arg ²	8,84	8,42	4,41	4,38	1,54; 1,54	1,62; 1,62	б, в		4,4	6,0	7,8
Pro ³			4,40	4,42	2,01; 1,74	2,23; 1,89	CγH 1,62; 1,62 C ^δ H 3,66; 3,41				
Pro ⁴			4,30	4,23	2,24; 1,72	2,15; 1,73					
Gly ⁵	8,26	8,29	3,78 3,53	3,96 3,81					2,6	2,7	5,8 5,9
Phe ⁶	8,38	8,25	4,44	4,57	3,06; 2,83	3,20; 3,05			2,4	7,7	8,8
Ser ⁷	8,13	7,89	4,70	4,66	3,93; 3,73	3,91; 3,68	ОН 6,01		4,9	5,8	7,8
Pro ⁸			4,23	4,25	1,90; 1,49	2,08; 1,53	CγH 1,63; 1,70 C ^δ H 3,71; 3,58				
Phe ⁹	7,88	7,78	4,47	4,64	2,97; 2,83	3,21; 2,94			2,8	5,0	8,7
Arg ¹⁰	7,72	7,99	4,15	4,33	1,64; 1,64	1,82; 1,82			3,8	5,6	8,8

а, б, в, г См. табл. 1.

данные, предполагается охарактеризовать пространственные структуры каждого из конформеров цикло-КЛ в растворах (CD₃)₂SO и H₂O.

Экспериментальная часть

Синтез цикло(1^ε–10)каллидина описан в работе [7]. Цикло-КЛ очищали от парамагнитных примесей с помощью методики [8].

Спектры ЯМР получены на спектрометре WM-360 Bruker (ФРГ) с рабочей частотой 360 МГц, оснащеном ЭВМ Aspect 2000. Обработку спектров проводили на автономной станции обработки данных, снабженной ЭВМ Aspect 1000. Спектры 0,005–0,12 М растворов цикло-КЛ в (CD₃)₂SO и H₂O снимали в 5-мм ампулах в интервале температур 293–353 К. Температурные коэффициенты амидных протонов определяли из COSY-спектров при температурах 293, 303, 313 и 323 К.

COSY-спектры получены с помощью последовательности 90-градусных импульсов [9]: (90° – t₁ – 90° – t₂)_n, где t₁ – период эволюции, t₂ – период наблюдения сигнала. Время t₁ изменялось в интервале 0,25–128 мс с шагом 0,25 мс, что соответствует ширине спектра в направлении F1 2000 Гц. Эксперимент повторялся 64 раза при каждом значении t₁. Фазы неселективных 90-градусных импульсов и опорной частоты приемника менялись, как в работе [10]. Во всех экспериментах квадратурное детектирование применялось в направлениях F2 и F1 при ширине спектров 4000 Гц.

Для получения фазоизбирательного COSY-спектра 1024 эквидистантных значения t₁ менялись в пределах 0,003–128 мс с шагом 0,125 мс, а фазы неселективных 90-градусных импульсов – как в работе [10].

NOESY-спектры получены с помощью последовательности неселективных 90-градусных импульсов [11]: (90° – t₁ – 90° – τ_m – 90° – t₂)_n, где t₁ – период эволюции, во время которого компоненты намагниченности частотно метяется, τ_m – время смешивания компонент намагниченности, в течение которого кросс-релаксация ЯЭО или химический обмен приводит к некогерентному обмену намагниченностями между пространственно сближенными или обменивающимися протонами.

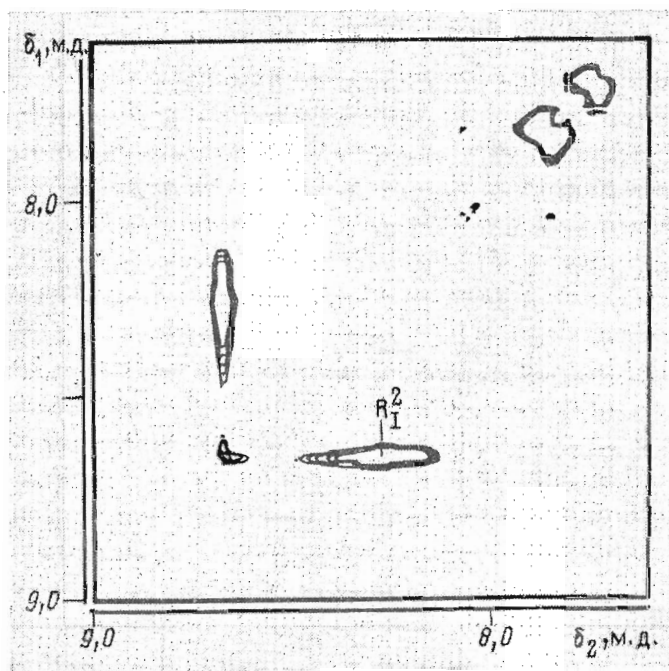


Рис. 6. Область фазонзбирательного NOESY-спектра δ_1, δ_2 : 7,6–9,0 м.д., $\tau_m=0,3$ с, 353 К. Показан обменный кросс-пик между протонами NH Arg² изомеров цикло-РЛ I и цикло-РЛ III

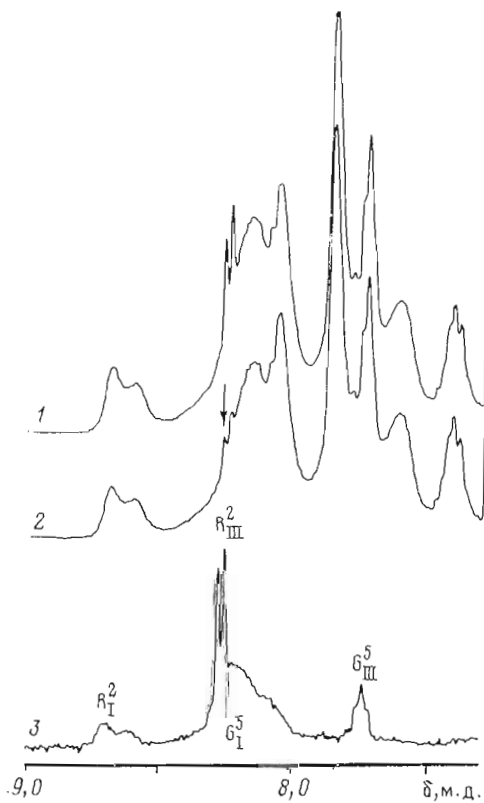


Рис. 7. 1 – область NH-протонов, спектр ^1H -ЯМР цикло-РЛ в $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$ при 353 К; 2 – тот же спектр при насыщенных сигналах NH Arg² цикло-РЛ III и NH Gly⁵ цикло-РЛ I (насыщение указано стрелкой); 3 – разность спектров 1 и 2, виден перешок намагниченности между протонами NH Arg² цикло-РЛ III и NH Arg² цикло-РЛ I, NH Gly⁵ цикло-РЛ I и NH Gly⁵ цикло-РЛ III

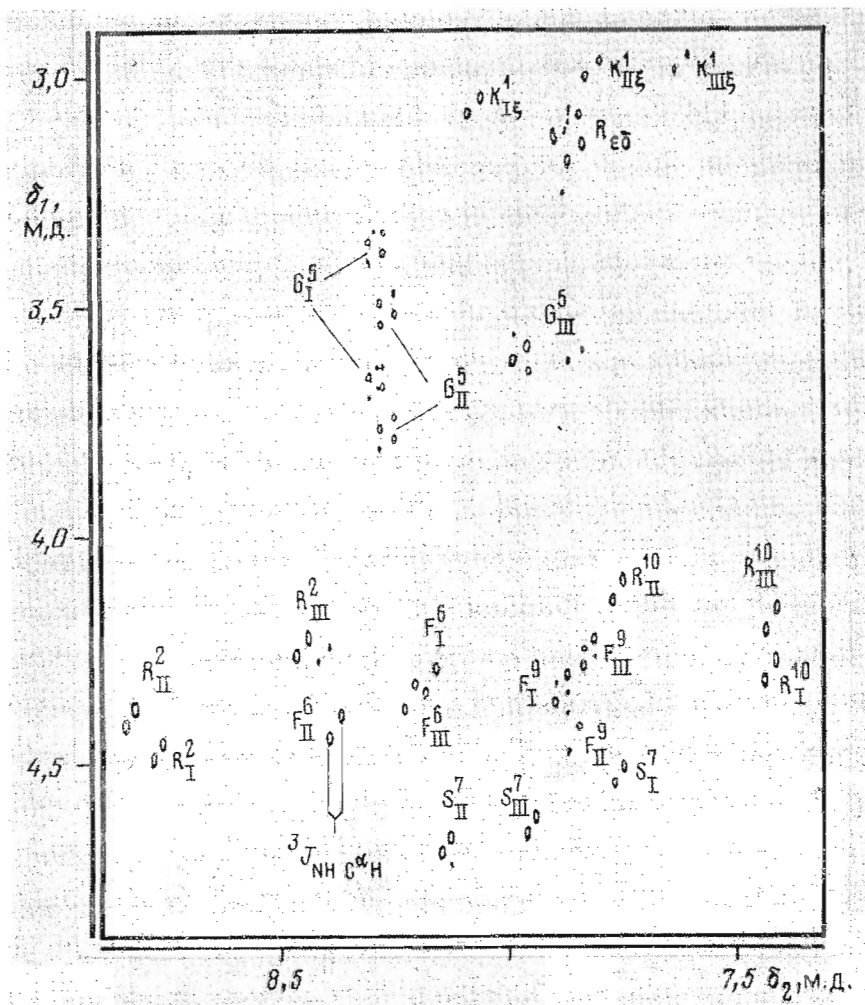


Рис. 8. Область фазоизбирательного COSY-спектра: δ_1 2,9–4,9 м.д., δ_2 7,3–8,9 м.д. Показаны характерные расщепления кросс-пиков, соответствующие КССВ $^3J_{NH\ C^\alpha H}$

Все NOESY-спектры снимались в фазоизбирательном виде, для чего фазы 90-градусных импульсов менялись, как описано в работе [10]. Для подавления когерентного переноса намагниченности, обусловленного спин-спиновым взаимодействием, время τ_m менялось случайным образом в пределах 10%. Эксперименты повторялись для 512–800 эквидистантных значений t_1 , лежащих в диапазонах 0,003–100 мс. Эксперимент повторялся 144 раза при каждом значении t_1 .

В экспериментах COSY и NOESY перед началом очередной серии импульсов следовал временной интервал 1 и 1,6 с соответственно для достижения равновесного состояния ядерной намагниченности.

Матрица данных COSY-спектра дополнялась нулями до размерности 1024×2048, что соответствует разрешению 3,9 Гц на точку. Для фазоизбирательного COSY-спектра данные дополнили нулями таким образом, чтобы после преобразования цифровое разрешение составляло 0,38 и 1,9 Гц на точку для направлений F_2 и F_1 соответственно.

Матрица данных фазоизбирательного NOESY-спектра дополнялась нулями до размерности 2048×2048, что после преобразования Фурье соответствует разрешению 3,9 Гц на точку в обоих направлениях. Перед преобразованием Фурье данные умножались на колоколообразные функции \sin и \sin^2 в направлениях F_1 и F_2 . Преобразование Фурье всех 2D-спектров проводилось с помощью программы Bruker DISNMRP, версия 840301.1. Химические сдвиги сигналов в спектрах 1H -ЯМР измерены относительно тетраметилсилана в $(CD_3)_2SO$ и *tert*-бутанола в H_2O с точностью $\pm 0,01$ м.д. Точность измерения КССВ $\pm 0,5$ Гц, ошибка $\Delta\delta_{NH}/\Delta T$ 10%. В одномерном эксперименте по переносу насыщения (рис. 6б) величина поля γH_2 составляла 20 Гц, а время облучения 0,8 с.

ЛИТЕРАТУРА

1. Regoli D., Barabe J. *Pharmacol. Rev.*, 1980, v. 32, № 1, p. 1-46.
2. Никуфорович Г. В., Галактионов С. Г., Чипенс Г. И. В кн.: Конформации пептидных биорегуляторов. М.: Медицина, 1983, с. 70-84.
3. Chipens G. I., Mutulis F. K., Myshlyakova N. Y., Misina I. P., Vitolina R. O., Klusha V. J., Katajev B. S. *Int. J. Peptide and Protein Res.*, 1985, v. 26, № 5, p. 460-468.
4. Wüthrich K., Billeter M., Braun W. J. *Mol. Biol.*, 1984, v. 180, № 2, p. 715-740.
5. Bodenhausen G., Ernst R. R. J. *Amer. Chem. Soc.*, 1982, № 5, p. 1304-1309.
6. Marion D., Wüthrich K. *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*, 1983, v. 113, № 3, p. 967-974.
7. Mutulis F. K., Chipens G. I., Lando D. I., Mutule I. E. *Int. J. Peptide and Protein Res.*, 1984, v. 23, № 2, p. 235-241.
8. Саулитис Ю. Б., Лиепиньш Э. Э., Секацис И. П., Шендерович М. Д., Мугулс Ф. К., Мугуле И. Э., Чипенс Г. И. *Биоорг. химия*, 1985, т. 11, № 8, с. 1013-1025.
9. Wider G., Macura S., Kumar A., Ernst R. R., Wüthrich K. J. *Magn. Reson.*, 1984, v. 56, № 1, p. 207-234.
10. Bodenhausen G., Kogler H., Ernst R. R. J. *Magn. Reson.*, 1984, v. 58, № 2, p. 370-388.
11. Jeener J., Meier B. H., Bachmann P., Ernst R. R. J. *Chem. Phys.*, 1979, v. 71, № 11, p. 4546-4553.

Поступила в редакцию
20.I.1986
После доработки
5.III.1986

INTERPRETATION OF ¹H-NMR SPECTRA OF CYCLIC ANALOGUE OF KALLIDIN IN SOLUTION

SAULITIS J. B., LIEPINS E. E., MUTULIS F. K., CHIPENS G. I.

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

¹H-NMR resonances of [cyclo(10-1⁸)]kallidin (cyclo-KL) in (CD₃)₂SO and H₂O have been assigned by combined analysis of two-dimensional phase-sensitive COSY and NOESY spectra. The presence of three slowly interchangeable conformers cyclo-KL I, cyclo-KL II, and cyclo-KL III, has been established, their population in (CD₃)₂SO being 25, 35 and 40%, respectively. Cyclo-KL I conformer possesses *trans*-configuration of all peptide bonds, but in the cyclo-KL II and cyclo-KL III conformers the Pro³-Pro⁴ and Arg²-Pro³ peptide bonds, respectively, have *cis*-configuration. In solution, the following exchange occurs between the conformers: cyclo-KL II ⇌ cyclo-KL I ⇌ cyclo-KL III. The assignment of ¹H-NMR signals of all the three cyclo-KL conformers has been carried out in H₂O by gradual titration with (CO₃)₂SO. The conformer populations in H₂O are 45, 25 and 30%, respectively.