



УДК 577.182.48.088.53

ПРОСТРАНСТВЕННЫЕ СТРУКТУРЫ ГРАМИЦИДИНА А
В ОРГАНИЧЕСКИХ РАСТВОРИТЕЛЯХ. ¹H-ЯМР-АНАЛИЗ
КОНФОРМАЦИОННОЙ ГЕТЕРОГЕННОСТИ В ЭТАНОЛЕ

Барсуков И. Л., Арсеньев А. С., Быстров В. Ф.

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

Исследованы двумерные спектры ¹H-ЯМР (COSY, RELSY, HONANA, NOESY*) [Val¹]грамцидина А (GA) в этаноле. Обнаружено, что в растворе присутствуют пять стабильных конформаций GA. Мономерная форма не имеет упорядоченной структуры. Для остальных четырех состояний димера GA (формы 1–4) на основании ядерного эффекта Оверхаузера между протонами построены карты коротких расстояний. Эти карты, а также константы спин-спинового взаимодействия протонов N–NC^α–H и доступность амидных групп NH растворителю соответствуют четырем видам двойных спиралей типа пл_{LD}^{5,6} с 5,6 остатка на виток. Формы 1 и 2 являются левыми параллельными двойными спиральями, различающимися относительным сдвигом полипептидных цепей, форма 3 – левая двойная антипараллельная спираль, форма 4 – правая двойная параллельная спираль. Эти структуры двойных спиралей обеспечивают максимально возможное число (28) водородных связей NH...O=C между основными цепями GA. Формы 1, 3 и 4 имеют ось симметрии C₂. Обсуждаются особенности пространственных структур GA в различных средах.

Пептидный антибиотик [Val¹]грамцидин А (GA) состоит из 15 чередующихся L- и D-аминокислотных остатков, N-концевая аминокислота формилирована, и C-концевая карбоксильная группа блокирована этанол-амином: HCO-L-Val-Gly-L-Ala-D-Leu-L-Ala-D-Val-L-Val-D-Val-L-Trp-D-Leu-L-Trp-D-Leu-L-Trp-D-Leu-L-Trp-NHCH₂CH₂OH. Биологической функцией GA является ингибирование синтеза РНК в продуцирующем микроорганизме [1–3]. Однако в настоящее время наибольшее внимание привлекает способность GA образовывать трансмембранный канал, селективно проводящий одновалентные катионы [4, 5]. Изучение аналогов с модифицированной аминокислотной последовательностью показало [2], что названные две функции GA не связаны между собой и, вероятно, соответствуют различным пространственным структурам молекулы.

Изучение GA в мицеллах додецилсульфата натрия, адекватно моделирующих мембранное окружение антибиотика, методами двумерной спектроскопии ¹H-ЯМР позволило установить, что трансмембранный канал образован правыми одиночными спиральями с 6,3 остатка на виток путем их ассоциации N-конец к N-конецу шесть межмолекулярными водородными связями [6–8].

В слабополярных растворителях GA образует четыре устойчивые, медленно переходящие одна в другую димерные формы (так называемые формы 1–4) [9, 10]. Принципиальная возможность существования таких структур показана теоретическим конформационным анализом [11, 12]. По данным спектроскопии КД [13], ни одна из этих форм не соответствует пространственной структуре GA в бислойных мембранах и мицеллах [6–8]. Не исключено, что принципы структурной организации GA вне мембран имеют значение для реализации его прямой биологической функции – ингибирования синтеза РНК [1–3]. Существование трех ти-

* Принятые сокращения: GA – грамцидин А, COSY – двумерная корреляционная спектроскопия, RELSY – двумерная трансляционная спектроскопия, HONANA – двумерная корреляционная спектроскопия с передачей когерентной намагниченности по механизму гомоядерной кросс-поляризации, NOESY – двумерная спектроскопия ядерного эффекта Оверхаузера, CCB – спин-спиновое взаимодействие.

пов двойных спиралей GA в растворе установлено экспериментально при помощи двумерной ^1H -ЯМР-спектроскопии. К ним относятся левая антипараллельная двойная спираль с 5,6 остатка на виток (форма 3) [14, 15], правая антипараллельная двойная спираль с 7,2 остатка на виток (комплекс GA с катионами Cs^+) [16] и правая параллельная двойная спираль с 5,6 остатка на виток (укороченный аналог GA, $\text{des-(L-Ala}^3\text{-D-Val}^6\text{)-[Val}^1\text{]}$ грамидин A, в диоксане) [17]. По данным спектроскопии КД [18], тип пространственной структуры этого аналога GA соответствует форме 4. Конформации форм 1 и 2 не были точно известны, и не было полной уверенности в идентичности пространственной структуры формы 4 GA и его укороченного аналога. Предполагалось на основании данных КД- и ИК-спектроскопии, что формы 1, 2 и 4 являются параллельными двойными спиральями, причем форма 4 отличается направлением закрутки спирали [9]. Выделение препаративных количеств форм 1, 2 и 4 сопряжено с существенными экспериментальными трудностями [9]. В связи с этим пришлось решать сложную задачу определения их конформации путем анализа двумерных спектров ^1H -ЯМР раствора GA в этаноле, содержащем набор структурных форм.

Характеристики двойных *L, D*-спиралей

Достоверность реконструкции пространственной структуры молекулы по данным спектроскопии ЯМР определяется двумя основными факторами: а) уникальностью соответствия между пространственной структурой и спектральными характеристиками; б) степенью согласования экспериментальных данных с теоретическими параметрами. В связи с этим, прежде чем переходить к анализу данных двумерной ^1H -ЯМР-спектроскопии, покажем, что каждому типу двойных спиралей соответствует уникальный набор спектральных данных.

На рис. 1 схематично показано строение различных типов двойных спиралей. Основой любой двойной *L, D*-спирали является β -структура, образованная двумя молекулами пептида. Благодаря чередованию *L*- и *D*-аминокислотных остатков все боковые цепи располагаются по одну сторону от плоскости β -складчатого листа. Это позволяет свернуть β -складчатый лист в соответствующую спираль с ориентированными наружу боковыми цепями. Различное направление закрутки приводит к появлению левых и правых двойных спиралей. В зависимости от взаимной ориентации полипептидных цепей в двойной спирали различают антипараллельные и параллельные двойные спиральи.

Для наглядности взаимного расположения полипептидных цепей в четырех возможных типах двойных спиралей сделаем их развертку на плоскости. Для этого «разрежем» одну, произвольно выбранную, полипептидную цепь, обозначаемую в дальнейшем цепью II (см. штриховую линию на рис. 2). Ориентируем развертки спиралей таким образом, чтобы другая полипептидная цепь I шла от N- к C-концу слева направо и боковые цепи находились над плоскостью β -листа, как показано на рис. 2 и 3. Расположение цепи II зависит от типа спирали и ее параметров.

Параметры n и m. Для описания различных типов антипараллельных и параллельных двойных спиралей достаточно использовать два параметра: *n* и *m*. Как показано на рис. 2, параметр *n* равен разности между номерами верхнего и нижнего аминокислотных остатков, принадлежащих цепи II и находящихся один напротив другого в β -структуре. Абсолютная величина параметра *n* характеризует шаг спирали, а его знак — направление закрутки спирали. Параметр *m* определяет сдвиг цепи II относительно цепи I в двойной спирали и равен числу остатков, на которое надо сдвинуть цепь II для того, чтобы перейти к данной структуре двойной спирали (рис. 2) от исходной структуры, где первый остаток цепи I находится напротив первого остатка в нижней части цепи II для параллельной двойной спирали или напротив последнего остатка в нижней части цепи II для антипараллельной спирали. Положительный знак *m* соответствует сдвигу цепи II влево, а отрицательный — направо. Если

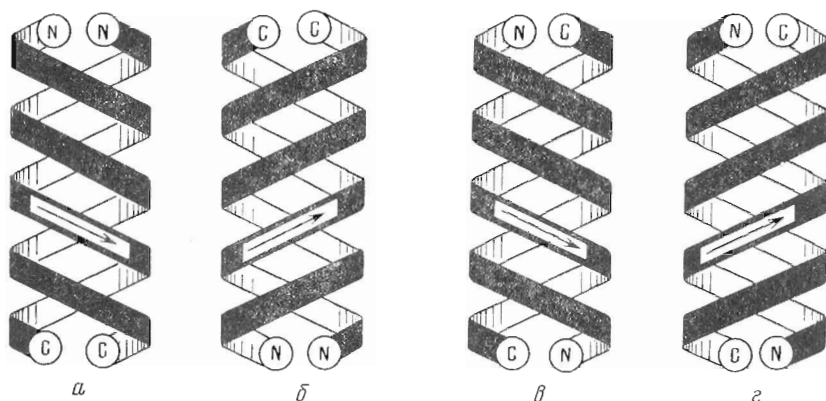


Рис. 1. Схематичное изображение строения различных типов двойных спиралей: *a* – левая параллельная, *б* – правая параллельная, *в* – левая антипараллельная, *г* – правая антипараллельная двойная спираль. Буквами N и C обозначены N- и C-концы полипептидной цепи соответственно. Стрелкой показано направление движения полипептидной цепи I от N- к C-концу

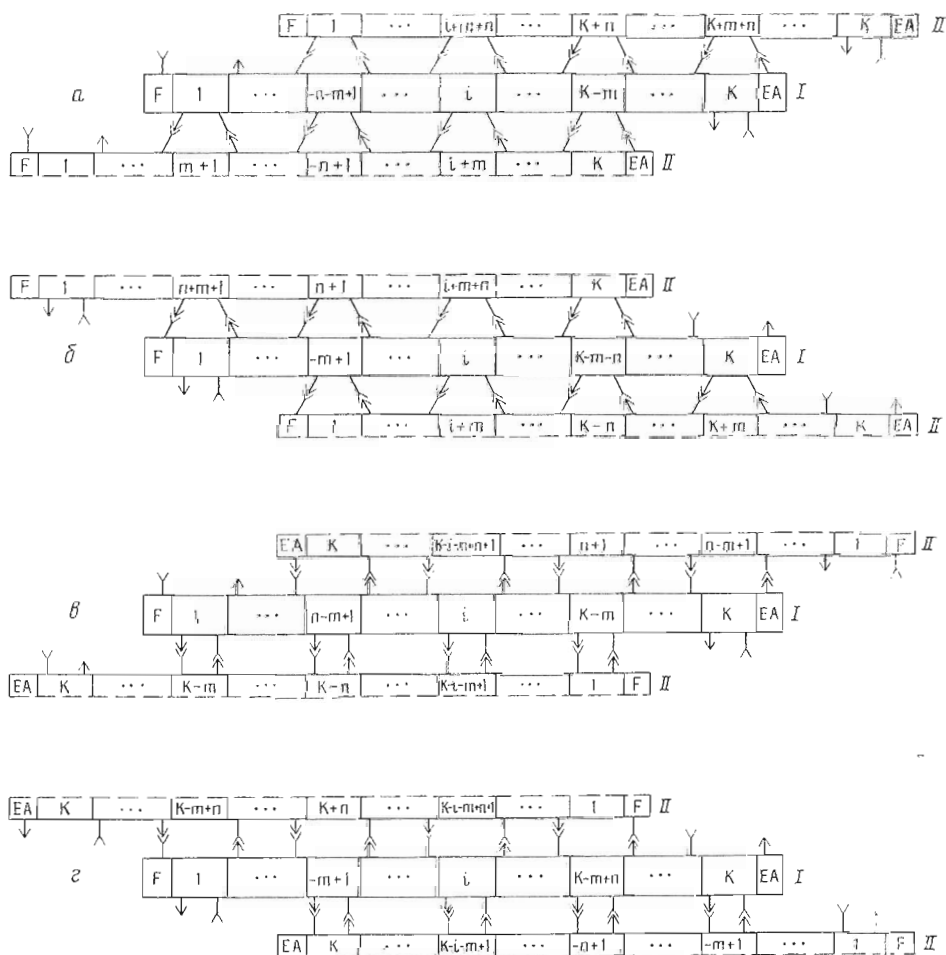


Рис. 2. Развертка на плоскости двойных спиралей GA: *a* – левая параллельная двойная спираль, *б* – правая параллельная двойная спираль, *в* – левая антипараллельная двойная спираль. Полипептидная цепь II разделена на две части вдоль штриховой линии. Номера остатков приведены внутри прямоугольников. F – N-концевая формильная группа, EA – C-концевой остаток этаноламина, NH-группы изображены стрелками, CO-группы – обратными стрелками. На этом рисунке и в дальнейшем используются следующие параметры: *K* – общее число остатков в цепи (для GA $K=15$), *n* – параметр, характеризующий шаг и направление закрутки спирали, *m* – относительный сдвиг цепей (см. текст)

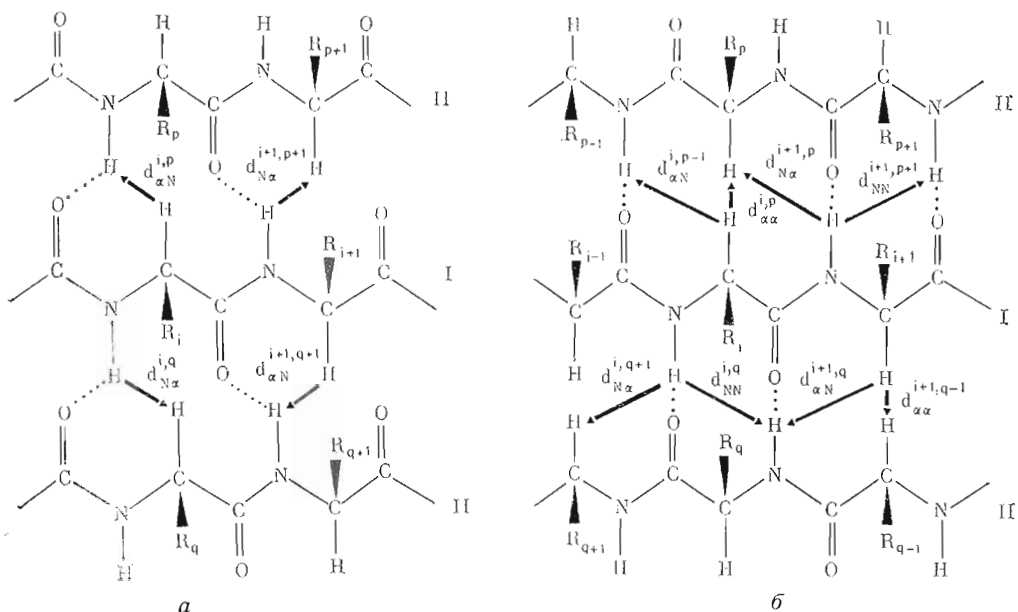


Рис. 3. Фрагменты двух полипептидных цепей I и II в двойных спиральях различного типа: *a* — параллельная двойная спираль, *б* — антипараллельная двойная спираль. Боковые цепи R аминокислотных остатков расположены над плоскостью рисунка, и, следовательно, остатки *i*, *p* и *q* имеют *L*-конфигурацию. Короткие расстояния между протонами основных цепей показаны стрелками и обозначены *d*. Нижние индексы при *d* указывают тип сближенных протонов: α — протоны C α -H-группы, N — протоны NH-групп. Верхние индексы указывают номера аминокислотных остатков. Первыми указаны индексы для протонов и остатков полипептидной цепи I, вторыми — для полипептидной цепи II

для параллельных спиралей в качестве цепи I взять другую полипептидную цепь, то, согласно определению, изменится величина относительного сдвига: $m' = -n - m$, хотя спираль останется прежней. Это означает, что параллельные спиральи с относительными сдвигами *m* и $-n - m$ эквивалентны и различаются лишь выбором цепи I. Для антипараллельных двойных спиралей перестановка полипептидных цепей I и II не изменяет величины *m* (рис. 2в, г). При рассмотрении двойных спиралей используется также параметр *K* — общее число аминокислотных остатков в цепи (для GA $K=15$).

Из приведенного выше определения следует, что знак параметра *n* определяется закруткой спирали: для левой параллельной спирали $n < 0$ (рис. 2а), для правой параллельной двойной спирали $n > 0$ (рис. 2б). В случае антипараллельных спиралей направление цепи II противоположно направлению цепи I. Это приводит к тому, что $n > 0$ для левой антипараллельной спирали (рис. 2в) и $n < 0$ для правой антипараллельной спирали (рис. 2г). Минимальная величина $|n|$ определяется минимальным возможным диаметром двойной спирали и равна 4, что соответствует спирали с 5,6 остатка на виток [13]. В работе [13] рассмотрены также спиральи с 7,2; 9,0 и 10,8 остатка на виток, для которых $|n|=6, 8$ и 10 соответственно.

Для реализации β -складчатых листов, образующих двойные спиральи, необходимо, чтобы напротив друг друга в полипептидных цепях I и II находились остатки одинаковой конфигурации. Это обеспечивает замыкание водородных связей (рис. 2 и 3). Поскольку двойные спиральи образованы одинаковыми полипептидными цепями с чередующимися *L*- и *D*-аминокислотными остатками, параметры *m* и *n* должны иметь четные значения.

Короткие межпротонные расстояния (контакты). Информация о пространственной сближенности протонов в молекуле до расстояний $< 4 \text{ \AA}$ может быть получена из кросс-релаксации между такими протонами, проявляющейся как ядерный эффект Оверхаузера (ЯЭО) в NOESY-

Короткие межпротонные расстояния в антипараллельных и параллельных двойных спиральных

Тип спирали *	L-остаток		D-остаток	
	Контакт	Расстояние **, Å	Контакт	Расстояние **, Å
Левая параллельная	$d_{N\alpha}^{i,q}$	2,7(3,0)	$d_{N\alpha}^{i,p}$	2,4(3,0)
$n \leq -4$	$d_{\alpha N}^{i,p}$	2,7(3,0)	$d_{\alpha N}^{i,q}$	2,4(3,0)
$q = i + m$	$d_{NN}^{i,q+1}$	3,7(4,0)	$d_{NN}^{i,p-1}$	3,7(4,0)
$p = q + n$	$d_{\alpha\alpha}^{i,p+1}$	3,7(4,8)	$d_{\alpha\alpha}^{i,q-1}$	3,7(4,8)
Правая параллельная	$d_{N\alpha}^{i,q}$	2,4(3,0)	$d_{N\alpha}^{i,p}$	2,7(3,0)
$n \geq 4$	$d_{\alpha N}^{i,p}$	2,4(3,0)	$d_{\alpha N}^{i,q}$	2,7(3,0)
$q = i + m$	$d_{NN}^{i,q+1}$	3,7(4,0)	$d_{NN}^{i,p-1}$	3,7(4,0)
$p = q + n$	$d_{\alpha\alpha}^{i,p+1}$	3,7(4,8)	$d_{\alpha\alpha}^{i,q-1}$	3,7(4,8)
Левая антипараллельная	$d_{N\alpha}^{i,q+1}$	2,6(3,2)	$d_{N\alpha}^{i,p+1}$	3,3(3,2)
$n \geq 4$	$d_{NN}^{i,q}$	3,4(3,3)	$d_{NN}^{i,p}$	3,4(3,3)
$q = K - i - m + 1$	$d_{\alpha N}^{i,p+1}$	3,3(3,2)	$d_{\alpha N}^{i,q+1}$	2,6(2,0)
$p = q + n$	$d_{\alpha\alpha}^{i,p}$	2,3(2,3)	$d_{\alpha\alpha}^{i,q}$	2,0(2,3)
Правая антипараллельная	$d_{N\alpha}^{i,q+1}$	3,3(3,2)	$d_{N\alpha}^{i,p+1}$	2,6(3,2)
$n \leq -4$	$d_{NN}^{i,q}$	3,4(3,3)	$d_{NN}^{i,p}$	3,4(3,3)
$q = K - i - m + 1$	$d_{\alpha N}^{i,p+1}$	2,6(3,2)	$d_{\alpha N}^{i,q+1}$	3,3(3,2)
$p = q + n$	$d_{\alpha\alpha}^{i,p}$	2,0(2,3)	$d_{\alpha\alpha}^{i,q}$	2,3(2,3)

* Определения параметров спирали m , n и K и индексов i , p и q см. рис. 2—4 и текст.

** Расстояния соответствуют идеальным двойным спиральям с $|n|=4$ (5,6 остатка на виток). В скобках указано расстояние для идеальной плоской β -структуры из работы [23].

спектрах [19, 20]. Найдем характерные наборы контактов между протонами двух основных цепей для различных типов спиралей. С этой целью рассмотрим контакты протонов NH и C ^{α} H i -го L-остатка и $(i+1)$ -го D-остатка полипептидной цепи I с протонами NH и C ^{α} H остатков p , q , $p \pm 1$ и $q \pm 1$ полипептидной цепи II в двойных спиральных. Эти контакты показаны стрелками на рис. 3а и б для фрагментов двух полипептидных цепей в параллельных и антипараллельных двойных спиральных. Из сравнения с рис. 2 следует, что для параллельных двойных спиралей индекс $q = i + m$, а индекс $p = i + m + n$. В свою очередь для антипараллельных двойных спиралей имеем $q = K - i - m + 1$, а $p = K - i - m + n + 1$.

Ожидаемые расстояния между протонами в двойных спиральных различного типа (табл. 1) вычислены из значений торсионных углов для регулярных двойных спиралей, теоретически рассчитанных в работе [12]. Геометрия аминокислотных остатков соответствует стандартным значениям ESEPP/2 [21, 22]. Координаты атомов получены с помощью программы CONFORNMR [8]. В табл. 1 приведены значения расстояний для идеальных плоских двухтяжевых β -складчатых листов [23] и для двойных спиралей наименьшего диаметра ($|n|=4$). Эти значения задают пределы, в которых могут изменяться короткие расстояния между протонами двух цепей двойной спирали при изменении числа остатков на виток ($|n|$) и, следовательно, ее диаметра. Для параллельных двойных спиралей, помимо контактов, показанных на рис. 3а, на расстояние 3,7—4,0 Å сближены протоны NH-групп ($d_{NN}^{i,q+1}$ и $d_{NN}^{i+1,p}$), а также на рас-

стояние 3,7–4,8 Å сближены протоны C^αH-групп ($d_{\alpha\alpha}^{i,p+1}$ и $d_{\alpha\alpha}^{i+1,q}$). Все остальные расстояния между протонами двух основных цепей ГА больше 4,5 Å. Для всех контактов рис. 3 в спектре следует ожидать кросс-пиков между сигналами соответствующих протонов. Набор кросс-пиков в NOESY-спектре позволяет определить систему контактов в двойной спирали и тем самым все ее параметры. Рассмотрим характерные наборы контактов для различных типов двойных спиралей.

В параллельных спиральных реализуются контакты между NH- и C^αH-протонами $d_{\alpha N}$ и $d_{N\alpha}$ остатков одинаковой конфигурации. Нет особой необходимости привлекать отмеченные выше контакты d_{NN} (3,7–4,0 Å) и $d_{\alpha\alpha}$ (3,7–4,8 Å), так как эти расстояния соответствуют пограничной области уверенной регистрации кросс-пиков. Для любого реализующегося контакта $d^{i,j}$ между протонами остатков i и j величина $j-i$ не зависит от положения остатков в последовательности, а определяется лишь видом контакта и параметрами m и n (табл. 1). Для определения параметров параллельной регулярной двойной спирали достаточно зарегистрировать, например, два межцепочечных контакта для одного, i -го остатка. Так, два контакта, $d_{N\alpha}^{i,i}$ и $d_{\alpha N}^{i,p}$, для i -го L -остатка позволяют определить $m=q-q$ и $n=p-q$. Аналогичным образом можно составить и другие комбинации индексов для определения параметров параллельных двойных спиралей.

Для антипараллельных спиралей должны уверенно наблюдаться все четыре возможных вида контактов: $d_{\alpha N}$, $d_{N\alpha}$, $d_{\alpha\alpha}$ и d_{NN} . При этом в отличие от параллельной двойной спирали контакты $d_{N\alpha}$ и $d_{\alpha N}$ реализуются для остатков с разной конфигурацией и для любого контакта $d^{i,j}$ величина $i+j$ не зависит от положения остатка в последовательности, а определяется лишь типом контакта и значениями m , n и K (табл. 1). Исходя даже из неполного набора контактов, для одного остатка можно определить все параметры спирали. Например, если для L -остатка антипараллельной двойной спирали реализуются контакты $d_{NN}^{i,q}$ и $d_{\alpha\alpha}^{i,p}$, то $m=K+1-q-i$ и $n=p-q$.

Карты характеристических контактов. Для определения типа двойной спирали удобно использовать графическое представление экспериментально обнаруженных коротких межпротонных расстояний (рис. 4). Видно, что для параллельных спиралей характерны две полосы, состоящие из контактов $d_{N\alpha}$ и $d_{\alpha N}$ и параллельные диагонали $i=j$, где i и j — номера остатков, отложенные по вертикали и горизонтали. В случае спиралей, имеющих ось симметрии C_2 , полосы располагаются на одинаковом расстоянии от диагонали $i=j$ (см. ниже). Различие карт левых и правых параллельных спиралей при одинаковой величине $|n|$ состоит в перестановке местами контактов $d_{N\alpha}$ и $d_{\alpha N}$.

Карты контактов для антипараллельных спиралей имеют четыре полосы, перпендикулярные диагонали $i=j$ (рис. 4в, г). Полосы располагаются парами, в которых одна полоса обусловлена контактами $d_{N\alpha}$ и $d_{\alpha N}$, а другая — $d_{\alpha\alpha}$ и d_{NN} . Карты левых и правых антипараллельных спиралей при одинаковой величине $|n|$ различаются перестановкой пары контактов $d_{\alpha N}$ и $d_{\alpha\alpha}$ с парой $d_{N\alpha}$ и d_{NN} .

Сопоставление карт коротких расстояний в двойных спиральных (рис. 4) с экспериментальными, полученными при анализе NOESY-спектров, позволяет определить тип спирали. Ее параметры можно получить, пользуясь соотношениями между индексами контактов для L - и D -остатков (табл. 1).

Симметрия. Наличие оси симметрии C_2 в двойной спирали приводит к тому, что химически эквивалентные протоны двух полипептидных цепей оказываются в одинаковом пространственном окружении и, следовательно, этим двум протонам в спектре ¹H-ЯМР соответствует только один сигнал. Условие симметрии C_2 в двойных спиральных тождественно условию сохранения карты контактов при перестановке цепей I и II. При перестановке цепей I и II карта контактов параллельных двойных спиралей сохраняется в случае расположения полос на одинаковом рас-

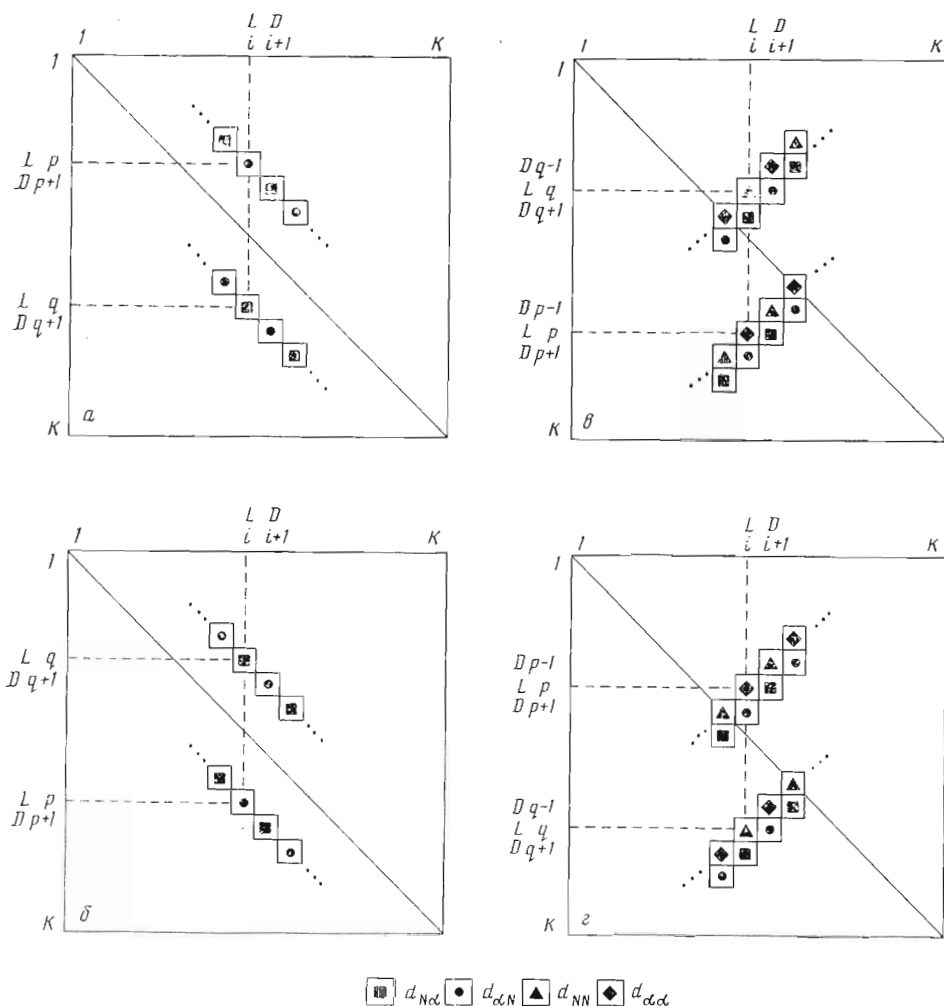


Рис. 4. Карты характеристических коротких расстояний между протонами основных цепей в двойных спиральях различного типа: *a* – левая параллельная двойная спираль, *б* – правая параллельная двойная спираль, *в* – левая антипараллельная двойная спираль, *г* – правая антипараллельная двойная спираль. По горизонтали указан номер аминокислотного остатка в цепи I, по вертикали – в цепи II (см. рис. 2 и 3). Буквы *L* и *D* обозначают конфигурацию остатка. Внизу приведены условные обозначения коротких расстояний

стоянши от диагонали $i=j$ (рис. 4*a, б*). Это является признаком симметрии параллельных спиралей. В параллельных двойных спиральях имеются контакты $d_{N\alpha}^{i, i+m}$ и $d_{\alpha N}^{i, i+m+n}$ (табл. 1). Для этих спиралей перемена двух цепей местами эквивалентна подстановке вместо m величины $-n-m$ (см. выше). Поэтому параллельные двойные спиральи будут симметричны при условии, что $i+m=i-n-m$ (для контактов $d_{N\alpha}$) и $i+m+n=i-m-n+n$ (для контактов $d_{\alpha N}$), т. е. при $n=-2m$. Поскольку m принимает четные значения и $|n| \geq 4$, симметричные параллельные двойные спиральи могут образовываться лишь при $|n|=4, 8, \dots$

Аналогичное рассмотрение показывает, что при перестановке цепей I и II в антипараллельных двойных спиральях карты контактов (рис. 4*в, г*) сохраняются независимо от параметров m и n . Следовательно, антипараллельные двойные спиральи всегда имеют ось симметрии C_2 . В случае параллельных двойных спиралей ось симметрии C_2 совпадает с продольной осью спирали, а в случае антипараллельных спиралей перпендикулярна ей.

Водородные связи. Число водородных связей $NH \dots O=C$ между полипептидными цепями двойных спиралей зависит от параметра сдвига m

и числа остатков на виток $|n|$. Как следует из рис. 2, в случае параллельных двойных спиралей в межцепочечных водородных связях не участвуют $|m|+|n+m|$ групп NH и равное количество CO-групп, т. е. образуется $2(K+1)-|m|-|n+m|$ водородных связей. В случае антипараллельных двойных спиралей в межцепочечных водородных связях не участвуют $|m|+|n-m|$ групп NH и равное количество CO-групп, т. е. образуется $2(K+1)-|m|-|n-m|$ водородных связей. Максимальное число межцепочечных водородных связей в двойных спиральных, равно $2(K+1)-|n|$, достигается при определенных соотношениях между m и n : для левых параллельных спиралей ($n \leq -4$) при $0 \leq m \leq -n$, для правых параллельных спиралей ($n \geq 4$) при $-n \leq m \leq 0$, для левых антипараллельных спиралей ($n \geq 4$) при $0 \leq m \leq n$ и для правых антипараллельных спиралей ($n \leq -4$) при $n \leq m \leq 0$.

2-D-СПЕКТРЫ ^1H -ЯМР

При растворении ГА в этаноле образуется смесь конформационных форм. В результате число сигналов в одномерном ^1H -ЯМР-спектре ГА в этаноле (рис. 5а) в несколько раз превышает число химически неэквивалентных протонов в молекуле. Для сравнения на рис. 5б приведен спектр формы β в диоксане. Набор пространственных структур можно наблюдать для ГА в метаноле [16], а также в диоксане, если предварительно не провести перекристаллизацию из этанола [15]. В нашем случае выбор этанола для изучения димерных форм ГА обусловлен высокой константой димеризации ($3 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}$ [10]) и хорошей растворимостью ГА в этом растворителе. Время жизни димерных форм ГА в этаноле превышает 0,5 ч [10].

Для получения из спектров ЯМР информации о пространственной структуре молекулы необходимо прежде всего провести отнесение сигналов в спектре ЯМР к определенным протонам в аминокислотной последовательности пептида. Первым этапом отнесения является выделение сигналов, принадлежащих одному аминокислотному остатку.

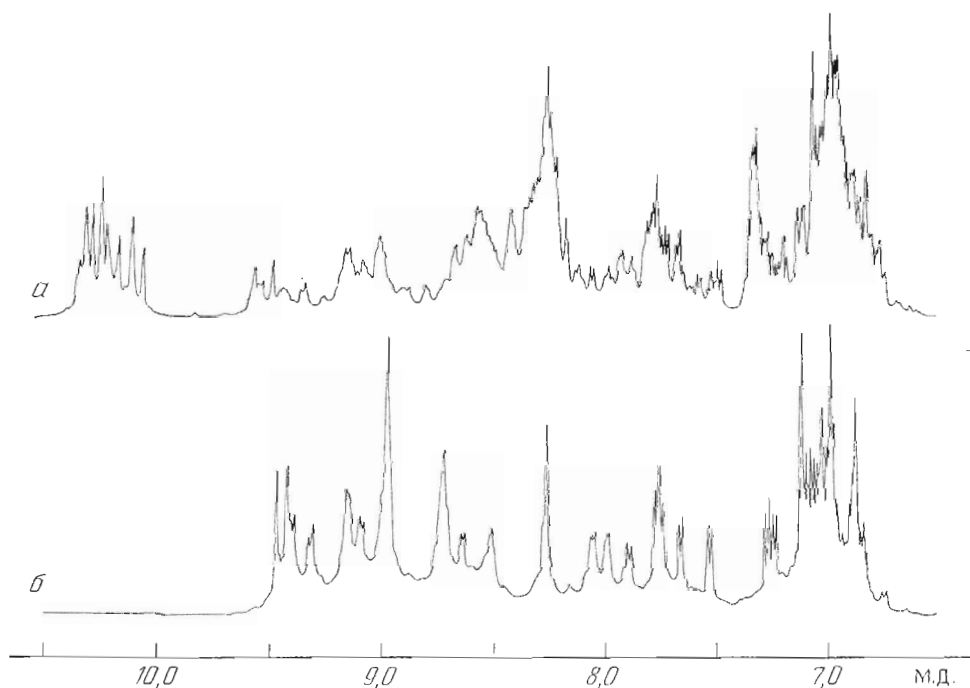


Рис. 5. Область сигналов от амидных, ароматических и формильных протонов спектров ^1H -ЯМР ГА в органических растворителях при 50°C : а — 30 мМ раствор ГА в этаноле- d_4 , б — 10 мМ раствор в диоксане- d_8 формы β ГА, полученной кристаллизацией из этанола

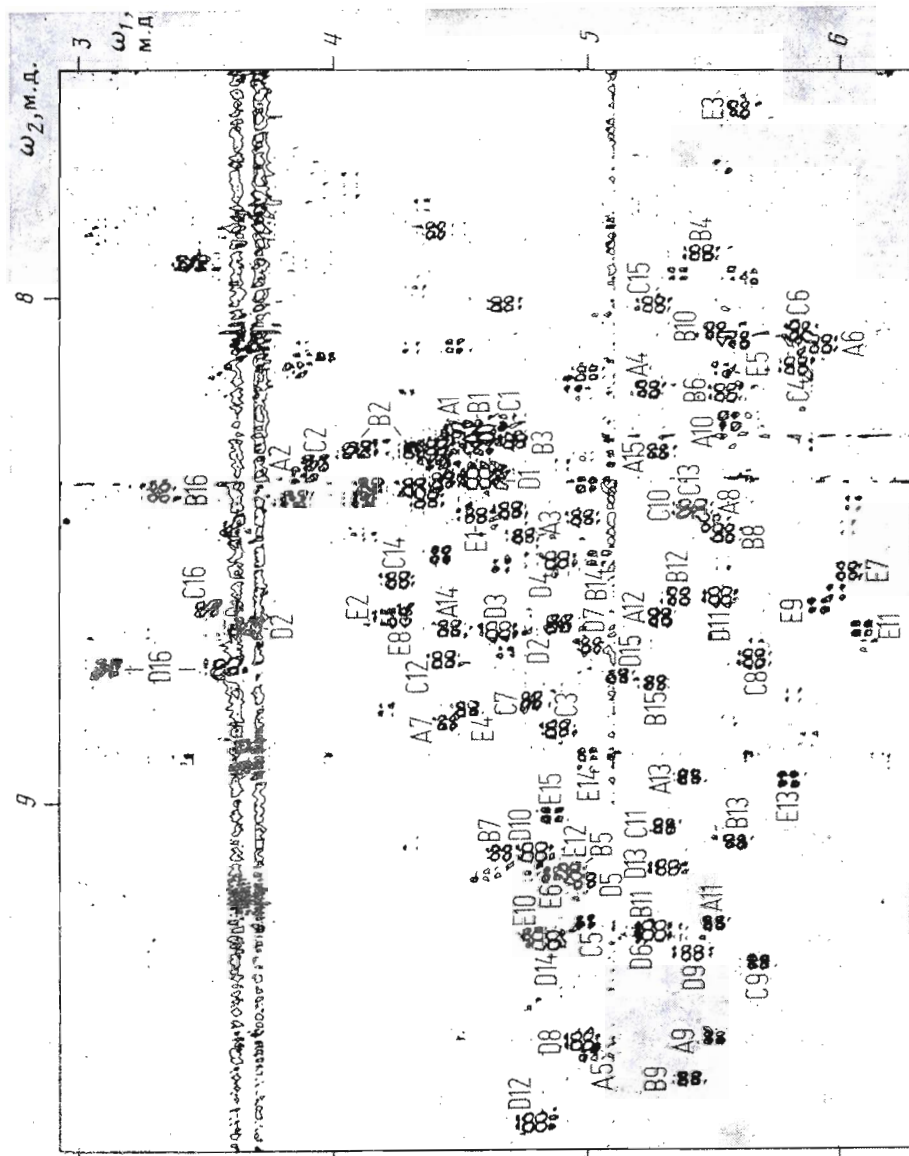


Рис. 6. Спектральная область ω_1 (2,9–6,3 м.д.) ω_2 (7,6–9,7 м.д.) фазоинвертированного COSY-спектра 30 мМ раствора GA в этаноле- d_6 при 50° С. Цифровое разрешение 2,44 Гц на точку для ω_1 и 0,67 Гц на точку для ω_2 . Одинаковым образом показаны положительные и отрицательные компоненты кросс-пиков. Здесь и далее показано отнесение кросс-пиков к протонам соответствующих аминокислотных остатков и этаноламина (цифры) конформационных состояний A, B, C, D и E полипептидной цепи GA (буквы), одновременно присутствующих в растворе

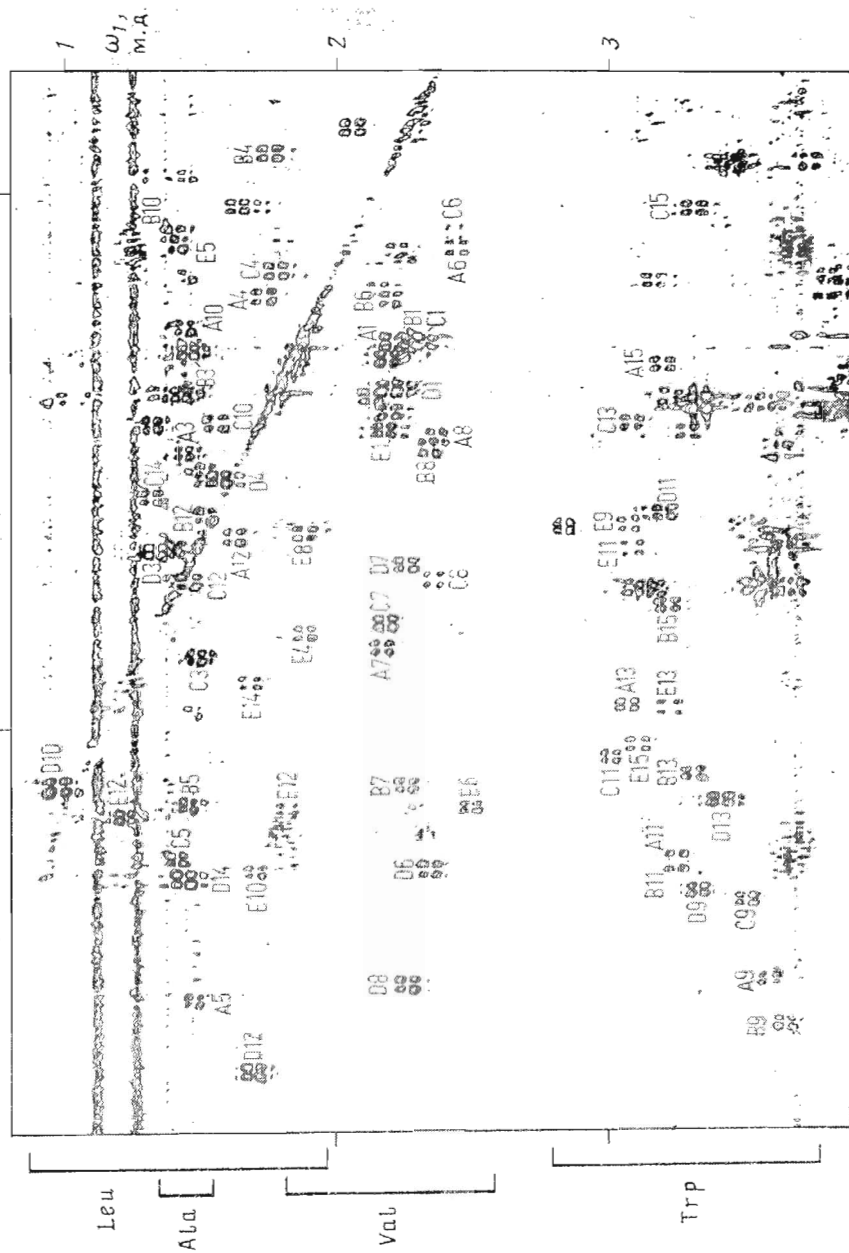


Рис. 7. Спектральная область ω_1 (0,8–3,9 м.д.), ω_2 (7,8–9,8 м.д.) фазоинвертирующего RFLSY-спектра 30 мМ раствора GA в этаноле- d_6 при 50°С. Указано отнесение кросс-пииков NH/СН конформационных состояний A – E полипептидной цепи GA. Слева отмечены спектральные области сигналов от протонов СН-групп остатков Trp, Val, Leu и Ala

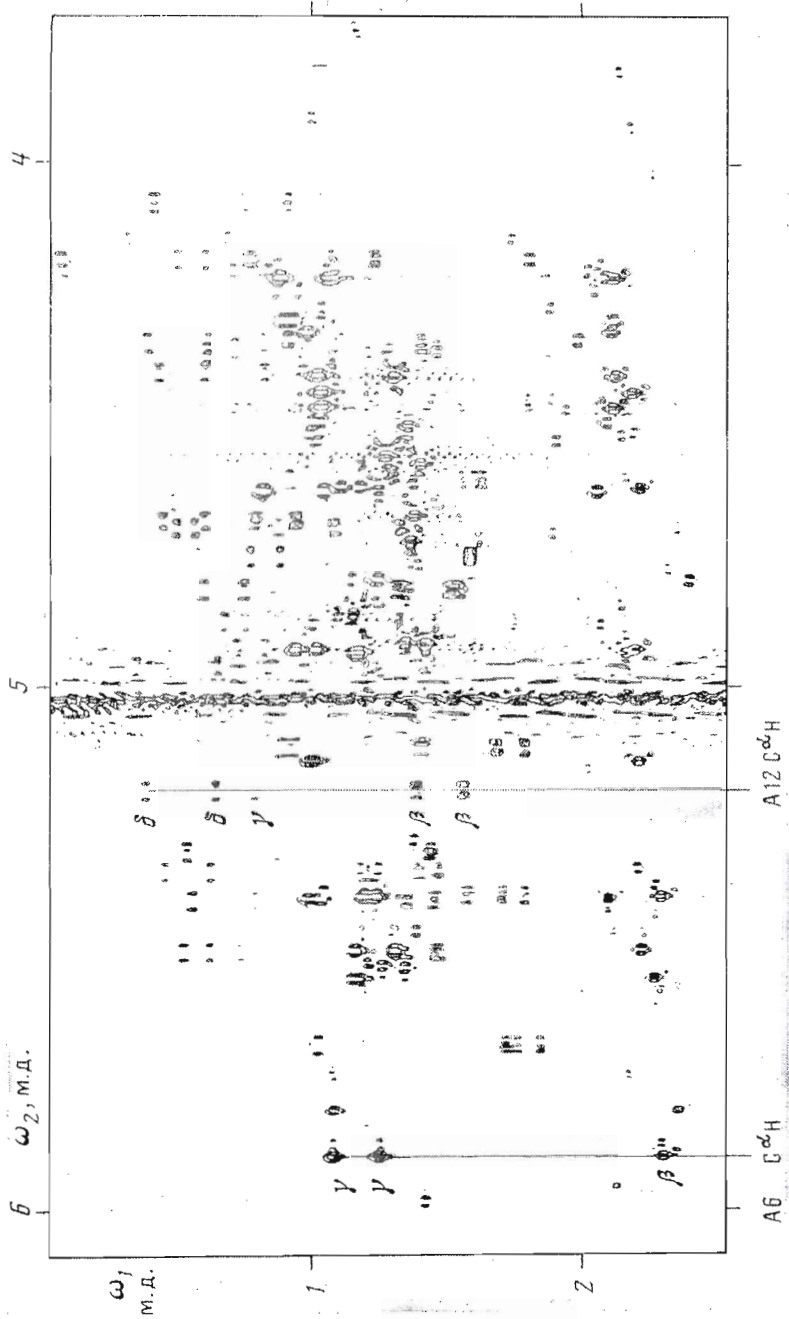


Рис. 8. Спектральная область ω_1 ($0,1-2,5$ м.д.), ω_2 ($3,7-6,1$ м.д.) фазоизбирательного ПОНАНА-спектра 30 мМ раствора GA в этаноле- d_6 при 50°C . В этой области расположены кросс-пики протонов C^αH с протонами C^βH и $\text{C}^\gamma\text{H}_3$ спиновых систем остатков валлина, а также протонов C^αH с протонами C^βH , C^γH и $\text{C}^\delta\text{H}_3$ остатков лейцина. В качестве примера показано отложение кросс-пиков $\text{C}^\alpha\text{H}/\text{C}^\beta\text{H}$ и $\text{C}^\alpha\text{H}/\text{C}^\gamma\text{H}_3$ остатка Val-6, а также кросс-пиков $\text{C}^\alpha\text{H}/\text{C}^\beta\text{H}$, $\text{C}^\alpha\text{H}/\text{C}^\gamma\text{H}$ и $\text{C}^\alpha\text{H}/\text{C}^\delta\text{H}_3$ остатка Leu-12 в конформационном состоянии Δ .

Химические сдвиги * (δ) протонов, константы спин-спинового взаимодействия (КССВ) протонов Н - NC α -Н и времена полуобмена амидных водородов на дейтерий ($t_{1/2}$) для 30 мМ раствора грамицидина А в этаноле- d_5 при 50° С

Аминорислотный остаток	δ ($\pm 0,01$), м. д.				КССВ HNC α H ($\pm 0,5$), Гц	$t_{1/2}$, ч
	NH	C α H	C β H	Другие протоны		
Цепь А (форма 1)						
Formyl				HCO		
L-Val-1	8,31	4,27	2,14	C γ H ₃	0,91; 0,91	<10
Gly-2	8,42	4,92; 3,66				<10
L-Ala-3	8,30	4,43	1,36			35
D-Leu-4	8,40	5,12	1,70; 1,40	C γ H	1,80	>100
				C δ H ₃	0,92; 0,88	8,8
L-Ala-5	9,58	4,92	1,44			40
D-Val-6	7,77	5,88	2,34	C γ H ₃	1,25; 1,08	10,3
L-Val-7	8,78	4,24	2,15	C γ H ₃	1,08; 0,86	8,1
D-Val-8	8,34	5,39	2,33	C γ H ₃	1,23; 1,20	9,9
L-Trp-9	9,42	5,45	3,57; 3,31			7,4
D-Leu-10	8,05	5,50	1,50; 1,34	C γ H	0,74	>100
				C δ H ₃	0,62; 0,52	9,6
L-Trp-11	9,15	5,41	3,19; 3,04			7,0
D-Leu-12	8,54	5,19	1,58; 1,39	C γ H	0,79	>100
				C δ H ₃	0,64; 0,37	9,2
L-Trp-13	8,85	5,34	3,02; -			7,7
D-Leu-14	8,56	4,40	1,41; 1,41	C γ H	0,82	>100
				C δ H ₃	0,60; 0,38	9,2
L-Trp-15	8,20	5,19	3,17; 2,96			8,5
EA	8,36	3,55; 2,94	-			<10
Цепь В (форма 2)						
Formyl				HCO	-	
L-Val-1	8,22	4,25	2,12	C γ H ₃	1,05; 0,89	<10
Gly-2	8,26	4,19; 4,02				30
L-Ala-3	8,23	4,59	1,41			30
D-Leu-4	7,91	5,33	1,73; 1,60	C γ H	1,80	70
				C δ H ₃	1,04; 1,04	8,5
L-Ala-5	8,90	4,73	1,37			8,1
D-Val-6	8,11	5,41	2,13	C γ H ₃	0,99; 0,99	9,9
L-Val-7	9,07	4,60	2,25	C γ H ₃	1,17; 1,10	7,7
D-Val-8	8,27	5,47	2,26	C γ H ₃	1,31; 1,17	9,6
L-Trp-9	9,45	5,26	3,59; 3,22			7,0
D-Leu-10	7,92	5,42	1,46; 1,36	C γ H	0,79	>100
				C δ H ₃	0,55; 0,55	9,2
L-Trp-11	9,19	5,20	3,21; -			>100
D-Leu-12	8,49	5,30	1,47; 1,38	C γ H	1,25	>100
				C δ H ₃	0,62; 0,45	9,9
L-Trp-13	8,99	5,50	3,26; 3,10			7,4
D-Leu-14	8,42	4,95	1,42; -	C γ H	0,83	>100
				C δ H ₃	0,65; 0,35	9,2
L-Trp-15	8,66	5,20	3,18; -			7,7
EA	8,36	3,55; 2,93	-			<10
Цепь С (форма 2)						
Formyl				HCO	-	
L-Val-1	8,26	4,43	2,19	C γ H ₃	1,04; 1,04	<10
Gly-2	9,28	4,54; 3,82				<10
L-Ala-3	8,66	4,69	1,38			20
D-Leu-4	8,12	5,71	1,81; 1,72	C γ H	1,86	80
				C δ H ₃	1,02; 1,02	9,9
L-Ala-5	9,17	4,87	1,31			7,4
D-Val-6	7,88	5,78	2,37	C γ H ₃	1,07; 1,07	9,9
L-Val-7	8,70	4,65	2,07	C γ H ₃	1,04; 0,82	7,7
D-Val-8	8,60	5,56	2,29	C γ H ₃	1,16; 1,16	9,9
L-Trp-9	9,26	5,61	3,46; 3,30			7,0
D-Leu-10	8,30	5,35	1,42; 1,42	C γ H	0,86	>100
				C δ H ₃	0,53; 0,53	8,8
L-Trp-11	8,95	5,21	2,92			7,0
D-Leu-12	8,62	4,35	1,28; 1,03	C γ H	0,82	>100
				C δ H ₃	0,59; 0,42	9,2
L-Trp-13	8,32	5,37	3,05; 2,98			8,8
D-Leu-14	8,47	4,19	1,22; 1,05	C γ H	-	>100
				C δ H ₃	0,60; 0,49	8,4
L-Trp-15	7,92	5,18	3,25; 3,03			8,5
EA	8,28	3,30; 2,80	-			<10

Таблица 2 (продолжение)

Амино- кислотный остаток	$\delta(\pm 0,01)$, м. д.				КССВ ННС $^{\alpha}$ Н ($\pm 0,3$), Гц	$t_{1/2}$, ч
	NH	C $^{\alpha}$ H	C $^{\beta}$ H	Другие протоны		
Цепь D (форма 3)						
Formyl				HCO	—	
L-Val-1	8,25	4,48	2,14	C $^{\gamma}$ H ₃	1,04; 1,04	9,2
Gly-2	8,53	4,78; 3,67				<10 ⁰
L-Ala-3	8,57	4,57	1,27			20 ⁰
D-Leu-4	8,40	4,84	1,54; 1,32	C $^{\gamma}$ H	—	30 ⁰
				C $^{\delta}$ H ₃	0,74; 0,59	9,5
L-Ala-5	9,01	4,85	1,16			6,3
D-Val-6	9,08	5,14	2,24	C $^{\gamma}$ H ₃	1,00; 1,00	9,6
L-Val-7	8,64	4,92	2,19	C $^{\gamma}$ H ₃	1,17; 1,17	7,7
D-Val-8	9,34	4,93	2,23	C $^{\gamma}$ H ₃	1,02; 0,93	9,6
L-Trp-9	9,12	5,35	3,27; —			6,6
D-Leu-10	9,00	4,65	0,94; 0,79	C $^{\gamma}$ H	—	9,2
				C $^{\delta}$ H ₃	0,60; 0,43	
L-Trp-11	8,51	5,44	3,19; 3,08			8,1
D-Leu-12	9,53	4,76	1,61; 1,61	C $^{\gamma}$ H	—	8,8
				C $^{\delta}$ H ₃	0,87; 0,77	
L-Trp-13	8,98	5,25	3,33; 3,22			6,6
D-Leu-14	9,14	4,69	1,33; 1,17	C $^{\gamma}$ H	0,87	9,6
				C $^{\delta}$ H ₃	0,57; 0,49	
L-Trp-15	8,55	5,05	3,28; 3,05			7,0
EA	8,61	3,51; 3,13	—			90
						<10
Цепь E (форма 4)						
Formyl				HCO	—	
L-Val-1	8,22	4,48	2,16	C $^{\gamma}$ H ₃	1,02; —	8,1
Gly-2	8,56	4,20; 4,10				<10 ⁰
L-Ala-3	7,56	5,50	1,26			8,8
D-Leu-4	8,73	4,46	1,82; 1,55	C $^{\gamma}$ H	1,42	8,1
				C $^{\delta}$ H ₃	—	>100 ⁰
L-Ala-5	7,99	5,54	1,35			8,8
D-Val-6	9,05	4,79	2,43	C $^{\gamma}$ H ₃	1,24; 1,15	7,0
L-Val-7	8,44	5,95	2,16	C $^{\gamma}$ H ₃	1,07; 0,91	9,9
D-Val-8	8,55	4,20	1,83	C $^{\gamma}$ H ₃	0,76; 0,76	8,8
L-Trp-9	8,52	5,85	3,03; —			9,2
D-Leu-10	9,16	4,72	1,64	C $^{\gamma}$ H	0,66	>100 ⁰
				C $^{\delta}$ H ₃	0,57; 0,47	>100 ⁰
L-Trp-11	8,58	5,99	3,04; —			9,5
D-Leu-12	9,07	4,88	1,77; 1,44	C $^{\gamma}$ H	1,32	8,1
				C $^{\delta}$ H ₃	0,75; 0,67	>100 ⁰
L-Trp-13	8,87	5,72	3,17; —			9,9
D-Leu-14	8,80	4,92	1,59; —	C $^{\gamma}$ H	—	7,0
				C $^{\delta}$ H ₃	0,82; 0,72	>100 ⁰
L-Trp-15	8,92	4,80	3,17; 3,05			8,5
EA	7,82	3,39; —	—			50 ⁰
						<10 ⁰

* Прочерк означает, что химический сдвиг соответствующего протона не определен.

В области COSY-спектра, соответствующей спин-спиновому взаимодействию протонов NH- и C $^{\alpha}$ H-групп (рис. 6), выделено около 100 кросс-пиков. Это указывает на присутствие в растворе шести различных состояний полипептидной цепи GA (для одного состояния максимальное число таких кросс-пиков составляет 16–18). Доминирующая форма 3 [9] представлена в спектре наиболее интенсивными сигналами, однако получить их отнесение путем прямого сопоставления с данными [12, 13] не удается из-за различия химических сдвигов сигналов протонов GA в этаноле и диоксане.

Для выделения сигналов спиновых систем протонов NH-, C $^{\alpha}$ H- и C $^{\beta}$ H-групп, принадлежащих одному аминокислотному остатку, использовали COSY- и RELSY-спектры (рис. 6 и 7). Наблюдаемые в COSY-спектре кросс-пики NH/C $^{\alpha}$ H и C $^{\alpha}$ H/C $^{\beta}$ H при совпадении химических сдвигов протонов C $^{\alpha}$ H различных остатков соотносили между собой анализом кросс-пиков NH/C $^{\alpha}$ H в RELSY-спектре. На основании положения сигналов от:

протонов $C^{\beta}H$ -групп в спектре и мультиплетной структуры кросс-пиков выделенные спиновые системы протонов $NH-C^{\alpha}H-C^{\beta}H$ отнесены к четырем типам спиновых систем аминокислотных остатков GA (аланинам, валинам, лейцинам и триптофанам), как показано на рис. 7.

Сигналы от протонов C^1H_3 -групп остатков валина и протонов $C^1H-(C^{\beta}H_3)_2$ остатков лейцина выделены в спектре НОНАНА. Кросс-поляризация, реализуемая в этом виде двумерного ЯМР-эксперимента, передает намагниченность между всеми протонами, входящими в спиновую систему аминокислотного остатка. Одинаковая фаза компонент мультиплетного сигнала резко повышает чувствительность этого способа по сравнению с другими методами 2 D-ЯМР. Доля переданной намагниченности зависит от значений констант ССВ протонов и времени гомоядерной кросс-поляризации в эксперименте НОНАНА (см. «Экспериментальную часть»). Используемые нами условия регистрации спектра НОНАНА позволили идентифицировать все кросс-пики $C^{\alpha}H/C^1H_3$ для остатков валина и все пики $C^{\alpha}H/C^{\beta}H_3$ для остатков лейцина (рис. 8). Некоторые из кросс-пиков $C^{\alpha}H/C^1H$ остатков лейцина отсутствовали или совпадали с кросс-пиками $C^{\alpha}H/C^{\beta}H$. Из-за этого не удалось определить химические сдвиги протонов C^1H -групп для ряда остатков лейцина (табл. 2). Спиновые системы индольных групп остатков триптофана не выделены из-за сильного перекрывания сигналов.

Дальнейшее отнесение сигналов к определенному положению аминокислотного остатка в первичной структуре GA выполнено как в работе [24], путем анализа контактов $'d_{\alpha N}$, $'d_{\beta N}$, $'d_{NN}$, отвечающих ЯЭО между NH-протоном данного остатка и соответственно протонами $C^{\alpha}H$, $C^{\beta}H$ и NH предыдущего по аминокислотной последовательности остатка. Для устранения неоднозначности отнесения сигналов и для выявления кросс-пиков, которые расположены вблизи интенсивной полосы от сигнала OH растворителя, снята серия спектров COSY, RELSY и NOESY при различных температурах (30, 40, 50 и 60°C). В результате получено надежное отнесение сигналов пяти состояний молекулы GA в этаноле (табл. 2), обозначенных буквами A-E. Для этих состояний в NOESY-спектрах наблюдали интенсивные кросс-пики, соответствующие контактам $'d_{\alpha N}$ каждого остатка. Контакты $'d_{\beta N}$ выявлены лишь в 12 случаях из 75 возможных. Кроме того, в NOESY-спектрах наблюдали 15 слабых по интенсивности кросс-пиков, соответствующих контактам $'d_{NN}$. В COSY-спектре (рис. 6) можно выделить еще 16 кросс-пиков, интенсивность которых близка к интенсивности кросс-пиков, отвечающих состоянию E. Эти сигналы принадлежат шестому состоянию GA. Их отнесение не удалось провести из-за близких значений химических сдвигов сигналов и малой интенсивности кросс-пиков, отвечающих контактам $'d_{\alpha N}$. Это состояние, по-видимому, соответствует мономеру GA, не имеющему определенной структуры. Об этом свидетельствует низкая интенсивность кросс-пиков ЯЭО и более узкие линии, чем для других состояний.

Пространственные структуры GA в растворе

На основании отнесения сигналов (табл. 2) в NOESY-спектре выделено большое число кросс-пиков, отвечающих взаимодействию между протонами, удаленными в аминокислотной последовательности (рис. 9). Эти данные представлены на рис. 10 в виде четырех карт ЯЭО-контактов протонов NH и $C^{\alpha}H$ основной цепи GA. Четыре карты соответствуют четырем типам пространственной структуры GA. Для состояний A, D и E все ЯЭО-взаимодействия происходят между протонами, принадлежащими одному состоянию GA (рис. 10a, в, г), тогда как протоны полипептидной цепи состояния B пространственно сближены с протонами полипептидной цепи состояния C (рис. 10б).

Наличие интенсивных ЯЭО-контактов $'d_{\alpha N}$, а также слабых интенсивных, а в большинстве случаев и отсутствующих $'d_{NN}$ -контактов и значения констант ССВ vicинальных протонов $H-NC^{\alpha}-H$ (табл. 2) указывают [25] на вытянутую структуру основной цепи GA в состояниях

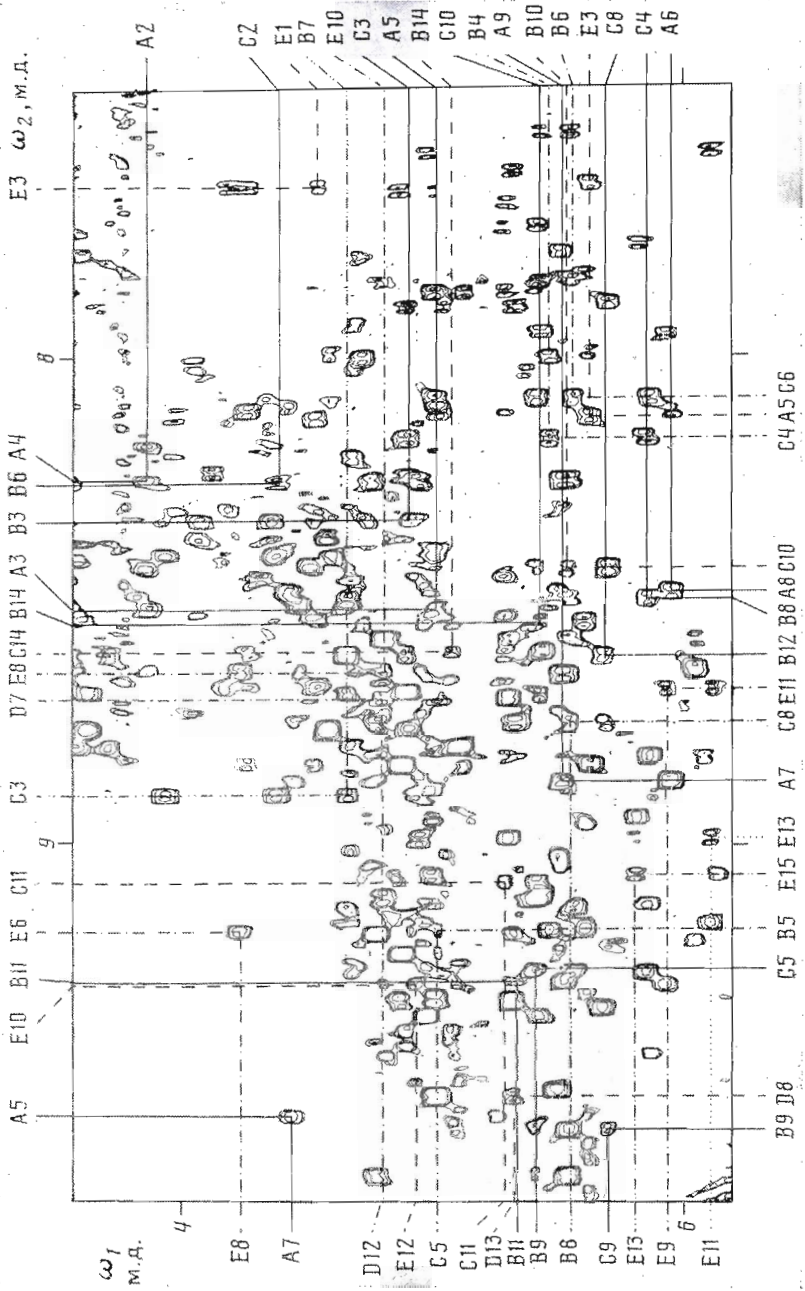


Рис. 9. Спектральная область ω_1 (3,6–6,2 м.д.), ω_2 (7,6–9,7 м.д.) фазонизированного NOESY-спектра 30 мМ раствора GA в этаноле- d_6 при 30°С. На полях диаграммы указано отнесение кросс-пиков ЯЭО между протонами амидных групп NH (вверху и внизу) и протонами C^αH (слева и справа) удаленных по амнон-кислотной последовательности остатков

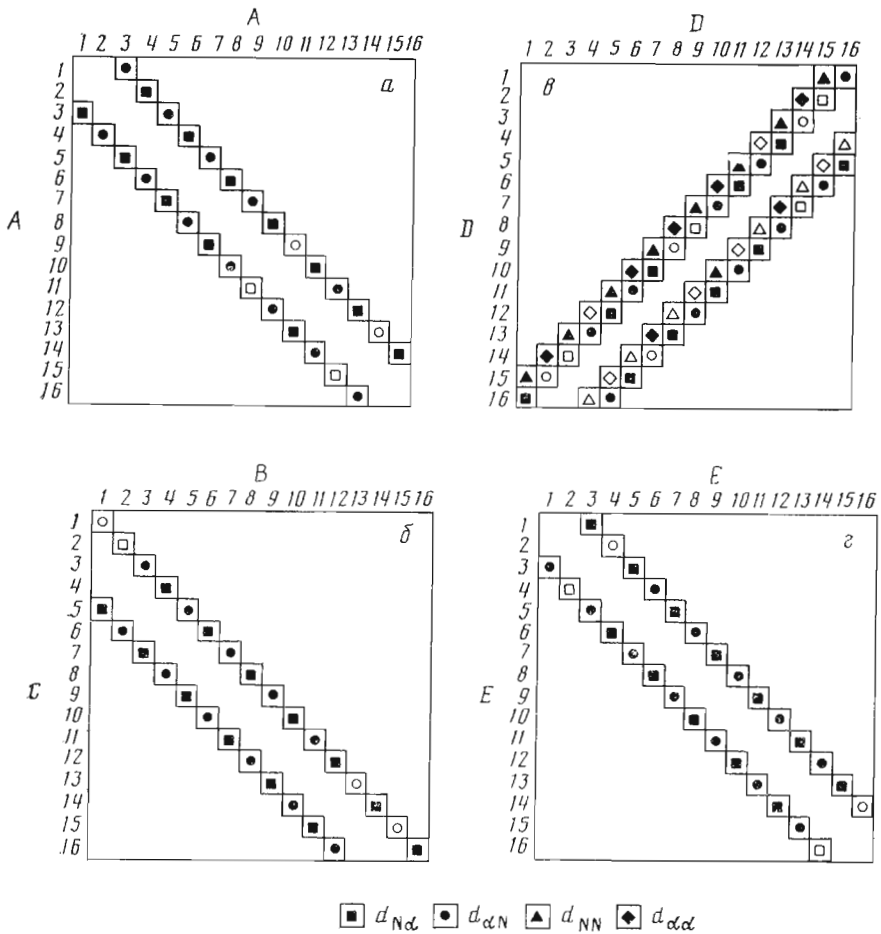


Рис. 10. Карты ЯЭО-контактов между протонами аминокислотных остатков для конформационных состояний *A–E* молекул GA, полученные при анализе NOESY-спектров: *a* – состояние *A* – левая параллельная двойная спираль ($n=-4, m=2$); *b* – состояние *B* и *C* – левая параллельная двойная спираль ($n=-4, m=4$) с неэквивалентными цепями; *c* – состояние *D* – левая антипараллельная двойная спираль ($n=4, m=0$); *d* – состояние *E* – правая параллельная двойная спираль ($n=4, m=-2$). Внизу приведены условные обозначения коротких расстояний. Незаполненные условные знаки соответствуют кросс-пикам, которые не удалось выявить, т. к. они попадали в перекрытую область спектра. Внутримолекулярные ЯЭО-контакты типа 4d не включены в карты

A–E. В этом случае для аминокислотных остатков, удаленных по последовательности, невозможно реализовать ЯЭО-контакты, обнаруженные в NOESY-спектрах (рис. 10). Для объяснения этих контактов необходимо предположить, что структуры GA в этаноле состоят из двух полипептидных цепей, т. е. образуются димерные формы. Эти структуры должны иметь ось симметрии C_2 , благодаря чему сигналы химически эквивалентных протонов двух цепей имеют одинаковый химический сдвиг. Для полипептидных цепей в конформационных состояниях *B* и *C* образование димера следует непосредственно из наблюдения перекрестных ЯЭО-контактов. Образование димерных структур GA в органических растворителях подтверждается данными работы [10]. Таким образом, все ЯЭО-взаимодействия, показанные на рис. 10, происходят между протонами в различных цепях димера.

Сопоставление экспериментально полученных карт коротких расстояний (рис. 10) с ожидаемыми для двойных спиралей различного типа (рис. 4) позволяет однозначно определить типы пространственных структур GA, одновременно реализующихся в органических растворителях. Все четыре карты тождественны картам двойных спиралей со значением

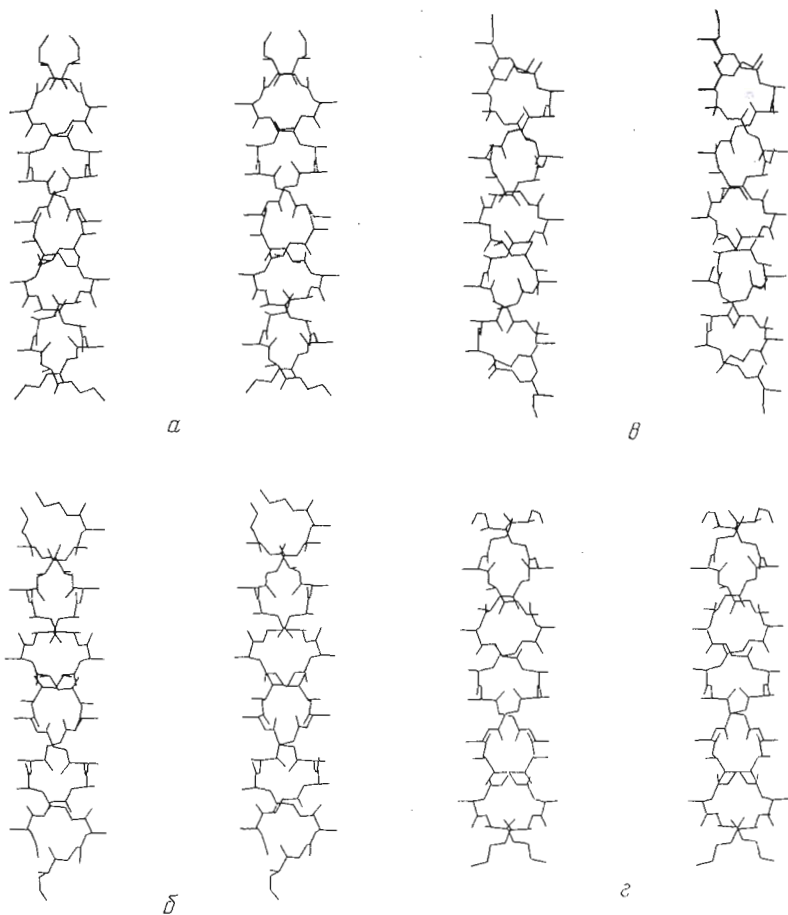


Рис. 11. Стереоскопическое изображение конформаций ГА, одновременно присутствующих в органических растворителях: *a* – форма 1 (состояние А), *б* – форма 2 (состояния В и С), *в* – форма 3 (состояние D), *г* – форма 4 (состояние E). Значения торсионных углов взяты из работы [12]. Боковые цепи аминокислотных остатков не показаны

параметра $|n| = |p - q| = 4$, что соответствует шагу спирали 5,6 остатка на виток. На карте контактов рис. 10в полосы контактов перпендикулярны диагонали $i = j$, что указывает на антипараллельную двойную спираль, знак параметра $n = -4$ отвечает левой закрутке, параметр сдвига $m = 0$. Эта $\uparrow\downarrow\text{пл}_{LD}^{5,6}$ -спираль имеет ось симметрии C_2 . На остальных картах (рис. 10а, б, г) полосы контактов параллельны диагонали $i = j$. Следовательно, это карты параллельных двойных спиралей, различающихся относительным сдвигом цепей и направлением закрутки. Полосы контактов на рис. 10а, г расположены на одинаковом расстоянии от диагонали $i = j$; значит, соответствующие двойные спирали имеют ось симметрии C_2 . Для карты на рис. 10а $n = -4$, $m = 2$, что соответствует левой двойной $\uparrow\uparrow\text{пл}_{LD}^{5,6}$ -спирали с эквивалентными цепями ГА в димере. Карте на рис. 10б ($n = -4$, $m = 0$) отвечает левая $\uparrow\uparrow\text{пл}_{LD}^{5,6}$ -спираль с неэквивалентными цепями. В свою очередь карта на рис. 10г соответствует параллельной двойной спирали с параметрами $n = 4$ и $m = -2$, т. е. правой двойной $\uparrow\uparrow\text{пл}_{LD}^{5,6}$ -спирали с эквивалентными цепями ГА. Конформации боковых цепей аминокислотных остатков в двойных спиральных установить не удалось из-за сильного перекрывания сигналов в ароматической и алифатической областях спектра $^1\text{H-NMR}$.

Пространственное строение основных цепей двойных спиралей ГА, полученное на основании данных о коротких расстояниях между протонами и константах ССВ протонов $\text{H}-\text{NC}^\alpha-\text{H}$, показано на рис. 11. Эти

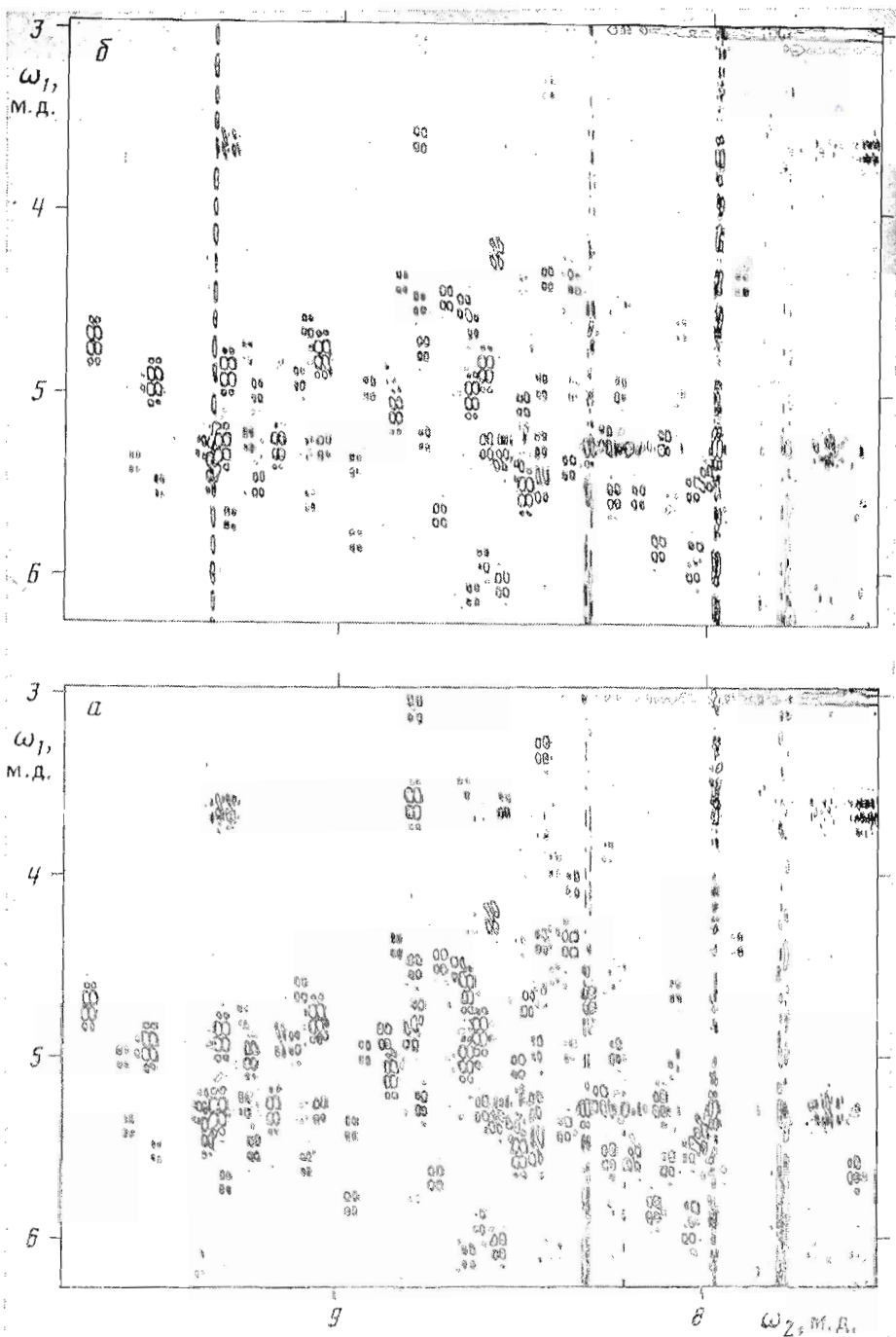


Рис. 12. Спектральная область ω_1 (3,0–6,2 м. д.), ω_2 (7,5–9,8 м. д.) фазонизбирательного COSY-спектра 30 мМ раствора GA в этаноле- d_6 при 30° С. Регистрации спектра пачата через 1 (а) и через 49 ч (б) после растворения. Время регистрации спектра 8 ч

структуры согласуются также с данными о временах полуобмена амидных протонов на дейтерий (табл. 2).

Для определения доступности протонов NH растворителю проводили регистрацию серии спектров COSY через разные промежутки времени t после растворения GA в этаноле- d_6 (см., например, рис. 12). По зависимости интенсивности кросс-пиков NH/C²H от t определены времена полуобмена $t_{1/2}$ (см. «Экспериментальную часть»). Большинство водородов

NH-групп медленно обмениваются на дейтерий растворителя ($t_{1/2} > 100$ ч, табл. 2), что указывает на их участие в водородных связях. Более быстрый обмен амидных водородов остатков Val¹, Gly², Ala³, Ala⁵ и этанол-аминной группы указывает на то, что либо эти группы NH, либо карбоксильные группы соответствующих пептидных связей HN—CO легко доступны для контактов со средой [26]. Дополнительным фактором, увеличивающим скорость обмена протонов NH-групп, может быть меньшая стабильность структуры в N-концевой части молекулы.

Соотнесение полученных двойных спиралей с ранее охарактеризованными по данным спектроскопии КД и ИК конформационными формами 1–4 можно провести на основании их содержания в растворе (16, 23, 46 и 14% для форм 1–4 соответственно [10]), а также используя ранее полученные данные о конформациях формы 3 [14, 15] и укороченного аналога GA, спектр КД которого аналогичен спектру КД формы 4 [17]. Наиболее интенсивные кросс-пики протонов NH/C^αH в спектре COSY (рис. 6) обозначены буквой D и относятся к антипараллельной двойной спирали (рис. 10в), которая, как показано в работах [14, 15], соответствует форме 3 GA. Форма 4 в отличие от остальных форм имеет положительный КД, и ее спектр близок к спектру КД укороченного аналога GA, имеющего конформацию правой параллельной двойной спирали [17]. В соответствии с этим единственная правая двойная спираль (рис. 11г) является конформацией формы 4 GA. Визуальная оценка интенсивностей сигналов в двумерных спектрах (рис. 6–8) показывает, что концентрация димера, образуемого цепями B и C, выше, чем концентрация димера, образуемого цепями A. Поэтому димер, образуемый цепями A (рис. 11а), отнесен нами к конформационной форме 1, а несимметричный димер, состоящий из неэквивалентных цепей B и C (рис. 11б), — к конформационной форме 2. Предположение о несимметричной структуре формы 2 было ранее высказано в работе [9] на основании расщепления сигнала от N-концевой формильной группы в спектрах ¹H-ЯМР.

Заключение

Таким образом, с помощью двумерной спектроскопии ¹H-ЯМР показано, что в органических растворителях GA образует димеры, представляющие собой двойные $\pi_{L,D}^{5,6}$ -спирали с 5,6 остатка на виток. Формы 1 и 2 являются левыми параллельными двойными спиралью. Они различаются взаимным расположением полипептидных цепей в структуре, т. е. параметром m . В форме 2 полипептидные цепи неэквивалентны ($m=4$), и эта форма не имеет оси симметрии. Форма 3 представляет собой левую двойную антипараллельную спираль. Форма 4 — это правая двойная параллельная спираль, являющаяся зеркальным отображением формы 1. В формах 1, 3 и 4 полипептидные цепи эквивалентны. Эти формы имеют ось симметрии C_2 , перпендикулярную (форма 3) и совпадающую (формы 1 и 4) с аксиальной осью. Структурные свойства двойных спиралей, такие, как диаметр гидрофильной аксиальной полости ~ 3 Å, гидрофобная внешняя поверхность, длина димера ~ 36 Å и число межцепочечных водородных связей (28), одинаковы для форм 1–4.

Чем же объяснить, что из большого разнообразия двойных спиралей (см. раздел «Характеристики двойных спиралей») в органических растворителях реализуются лишь четыре? Одним из факторов является требование минимальной экспонированности полярных CO- и NH-групп в слабополярную окружающую среду, т. е. образования максимального числа межпептидных водородных связей. Среди всех возможных типов двойных спиралей наибольшее число межцепочечных водородных связей $2(K+1) - |n| = 28$ реализуется при минимальном шаге спирали ($|n|=4$). Параметр m для форм 1–4 также удовлетворяет условию замыкания максимального числа водородных связей. Малый диаметр гидрофильной внутренней полости в двойных $\pi_{L,D}^{5,6}$ -спиралях делает ее малодоступной молекулам органического растворителя. Поэтому для образования в органи-

ческих растворителях двойных спиралей большего диаметра необходимо чем-то компенсировать их дополнительную гидрофильность и уменьшение числа межцепочечных водородных связей. Такой компенсацией может быть взаимодействие СО-групп с ионами металлов. В работе [16] установлено, что при добавлении катионов Cs^+ к раствору ГА в смеси хлороформ — метанол доминирующей структурой становится правая антипараллельная двойная спираль $\uparrow\downarrow\text{пл}_{LD}^{7,2}$ с 7,2 остатка на виток ($n=6$).

Среди двойных спиралей наименьшего диаметра помимо обнаруженных экспериментально для ГА в настоящей работе есть еще шесть структур, удовлетворяющих требованию максимального числа водородных связей. К ним относятся одна параллельная двойная спираль — правая $\uparrow\uparrow\text{пл}_{LD}^{5,6}$ ($n=4$, $m=-4$) и пять антипараллельных двойных спиралей — две левые $\uparrow\downarrow\text{пл}_{LD}^{5,6}$ ($n=4$ с $m=2$ и 4) и три правые $\uparrow\downarrow\text{пл}_{LD}^{5,6}$ ($n=-4$ с $m=0$, -2 и -4). Однако пространственная ориентация боковых цепей аминокислотных остатков ГА на поверхности этих структур, вероятно, не обеспечивает их оптимального взаимодействия между собой и со средой. В этой связи интересно отметить, что изменение аминокислотной последовательности ГА в случае $\text{des}-(L\text{-Ala}^3, D\text{-Leu}^4, L\text{-Ala}^5, D\text{-Val}^6) - [\text{Val}^1]$ -грамцидина А приводит в диоксане к одной доминирующей структуре — правой двойной $\uparrow\uparrow\text{пл}_{LD}^{5,6}$ -спирали [17].

Итак, в зависимости от природы внешней среды ГА образует фундаментально различные устойчивые пространственные структуры: правую $\uparrow\downarrow\text{пл}_{LD}^{6,3}$ -спираль (в мицеллах и мембранах) [6–8], правую двойную $\uparrow\downarrow\text{пл}_{LD}^{7,2}$ -спираль (в органических растворителях в присутствии ионов Cs^+) [16] и, как показано в данной работе, четыре типа двойных спиралей с шагом 5,6 остатка на виток в органических растворителях.

Таким образом, аминокислотная последовательность и природа окружающей среды, как определяющие факторы для пространственной структуры полипептидов, могут допускать одновременное сосуществование нескольких устойчивых конформационных форм.

Экспериментальная часть

ГА выделен методом противоточного распределения [27] из грамицидина D (Serva, ФРГ). По данным аминокислотного анализа, примесь $[\text{Phe}^1]$ грамицидина А в использованном для исследования препарате составляла 4–5%.

Для получения спектров ^1H -ЯМР применяли 30 мМ растворы ГА в $\text{CD}_3\text{CD}_2\text{OH}$ или $\text{CD}_3\text{CD}_2\text{OD}$ (98% дейтерия, «Изотоп», СССР). После растворения образец выдерживали 5 ч для установления равновесия между различными конформационными состояниями ГА.

Спектры ^1H -ЯМР получены при радиочастоте 500 МГц на спектрометре WM-500 Bruker (ФРГ), оснащенном ЭВМ типа Aspect-3000. Химические сдвиги измерены относительно внутреннего стандарта тетраметилсилана. Все спектры зарегистрированы в фазоизбирательном режиме [28]. Двумерные корреляционные спектры (COSY) и спектры ядерного эффекта Оверхаузера (NOESY) получены как в работе [17]. Для уменьшения t_1 -полос часть NOESY-спектров получена путем детектирования $\sin(\omega t_1)$ - и $\sin(\omega t_2)$ -составляющих сигналов [29]. Время смешивания компонент намагниченности в спектрах NOESY (τ_m) составляло 0,2 с. Двумерные трансляционные корреляционные спектры (RELSY) с одноступенчатой передачей когерентности по механизму скалярного ССВ получены как в работе [15] при значении временного интервала $\tau=25$ мс. Двумерные корреляционные спектры с передачей поперечной намагниченности по механизму гомоядерной кросс-поляризации через ССВ (НОНАНА) регистрировали с помощью импульсной последовательности [30]:

$$90^\circ - t_1 - \text{SL}_x - \text{MLEV17} - \text{SL}_x - t_2,$$

где t_1 — время эволюции, t_2 — период наблюдения сигнала. Радиочастотные импульсы SL_x (spin-locking) длительностью 5 мс служат для выделения компоненты намагниченности, параллельной оси x . Для осуществления гомоядерной кросс-поляризации применена последовательность составных 180-градусных импульсов MLEV17 [30], позволяющая расширить диапазон химических сдвигов сигналов от протонов, между которыми происходит передача намагниченности. Импульсная последовательность эксперимента НОНАНА реализована с использованием усилителя мощности f_2 -канала спектрометра. Амплитуда радиочастотного поля соответствовала спектральной ширине 10 кГц и длительности неселективного 90-градусного импульса 25 мкс. Учитывая зависимость эффективности передачи намагниченности от значения констант

ССВ протонов, участвующих в передаче поперечной намагниченности, спектры НОНАНА регистрировали при двух значениях времени действия последовательности MLEV17: 30 и 40 мс.

Для измерения скоростей дейтерообмена пептидных NH-групп с растворителем ($\text{CD}_3\text{CD}_2\text{OD}$) зарегистрировали серию COSY-спектров (аналогично работе [31]) через 1, 9, 25, 49 и 72 ч после растворения. Во время всего эксперимента температуру образца поддерживали при 30°С. Время накопления одного спектра составляло 8 ч. В таком эксперименте в отличие от описанного в работе [31] нельзя пренебречь обменом во время регистрации спектра. При этом для амплитуды $I(t)$ кросс-пика NH/C α H можно получить аналогично [31] следующую зависимость:

$$I(t) = I_0 e^{-t/t_{1/2}} \int_0^{t_0} \frac{e^{-t'/t_{1/2}}}{t_0} dt' = e^{-t/t_{1/2}} \left[I_0 \frac{t_{1/2}}{t_0} (1 - e^{-t_0/t_{1/2}}) \right],$$

где $t_{1/2}$ — время полуобмена амидных водородов на дейтерий, t_0 — время накопления COSY-спектра, I_0 — начальная амплитуда кросс-пика, t — отрезок времени от растворения образца до начала регистрации соответствующего спектра. Выражение в квадратных скобках одинаково для всей серии COSY-спектров. Это позволяет определять времена $t_{1/2}$ из угла наклона зависимости логарифма амплитуды кросс-пиков NH/C α H от времени t . Для измерения амплитуды применяли специально созданную программу поиска максимумов в двумерных спектрах. Используемые значения промежутков времени между растворением образца и съемкой двумерных спектров позволяют получать достоверные значения $t_{1/2}$ в интервале $10 < t_{1/2} < 100$ ч.

При регистрации двумерных спектров ^1H -ЯМР после окончания времени наблюдения t_2 перед началом следующей серии импульсов следовал временной интервал 1,2–2,2 с для достижения равновесного состояния ядерной намагниченности. Во всех экспериментах использовали квадратурное детектирование во время t_1 и t_2 . Для увеличения динамического диапазона спектров сигнал от группы OH растворителя ($\text{CD}_3\text{CD}_2\text{OH}$) насыщали селективным радиочастотным полем в течение всего эксперимента, за исключением времени наблюдения сигнала t_2 .

Преобразование Фурье для получения фазоизбирательных двумерных спектров выполнено с помощью программы DISR861 (Bruker). Матрицы данных во временной области (512×4096 точек) дополняли нулями таким образом, чтобы после преобразования Фурье цифровое разрешение составляло 1,2 и 2,4 Гц на точку соответственно для направлений ω_2 и ω_1 . Для увеличения цифрового разрешения при измерении констант ССВ в двумерном спектре выбирали соответствующее сечение по координате ω_1 , делали обратное фурье-преобразование, данные дополняли нулями и производили преобразование Фурье. В результате достигали цифрового разрешения 0,32 Гц на точку.

Авторы выражают благодарность А. Л. Ломизе за вычисление координат атомов регулярных двойных спиралей и А. З. Гуревичу за помощь в проведении эксперимента НОНАНА.

ЛИТЕРАТУРА

1. Sarkar N., Langley D., Paulus H. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1977. V. 74. № 4. P. 1478–1482.
2. Paulus H., Sarkar N., Mukhejee P. K., Langley D., Ivanov V. T., Shepel E. N., Veatch W. // Biochemistry. 1979. V. 18. № 21. P. 4532–4536.
3. Fisher R., Blumenthal T. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1982. V. 79. № 4. P. 1045–1048.
4. Ivanov V. T. // Peptides/Eds Blaha K., Malon P. West Berlin: Walter de Gruyter, 1983. P. 73–89.
5. Ovchinnikov Yu. A., Ivanov V. T., Shkrob A. M. Membrane active complexones. Amsterdam: Elsevier, 1974.
6. Arseniev A. S., Barsukov I. L., Bystrov V. F., Lomize A. L., Ovchinnikov Yu. A. // FEBS Lett. 1985. V. 186. № 2. P. 168–174.
7. Арсеньев А. С., Барсуков И. Л., Быстров В. Ф., Овчинников Ю. А. // Биол. мембраны. 1986. Т. 3. № 5. С. 437–462.
8. Арсеньев А. С., Ломизе А. Л., Барсуков И. Л., Быстров В. Ф. // Биол. мембраны. 1986. Т. 3. № 11. С. 1077–1104.
9. Veatch W. R., Fossel E. T., Blout E. R. // Biochemistry. 1974. V. 13. № 26. P. 5249–5256.
10. Veatch W. R., Blout E. R. // Biochemistry. 1974. V. 13. № 26. P. 5257–5263.
11. Lotz B., Colonna-Cesari F., Heitz F., Spach G. // J. Mol. Biol. 1976. V. 106. № 4. P. 915–942.
12. Colonna-Cesari F., Premilat S., Heitz F., Spach G., Lotz B. // Macromolecules. 1977. V. 10. № 5. P. 1284–1288.
13. Wallace B. A., Veatch W. R., Blout E. // Biochemistry. 1981. V. 20. № 20. P. 5754–5760.
14. Arseniev A. S., Bystrov V. F., Ivanov V. T., Ovchinnikov Yu. A. // FEBS Lett. 1984. V. 165. № 1. P. 51–56.
15. Арсеньев А. С., Барсуков И. Л., Сычев С. В., Быстрова В. Ф., Иванов В. Т., Овчинников Ю. А. // Биол. мембраны. 1984. Т. 1. № 1. С. 5–17.
16. Arseniev A. S., Barsukov I. L., Bystrov V. F. // FEBS Lett. 1985. V. 180. № 1. P. 33–39.

17. Арсеньев А. С., Барсуков И. Л., Шепель Е. Н., Быстров В. Ф., Иванов В. Т. // Биоорган. химия 1985. Т. 11. № 1. С. 5–20.
18. Sychev S. V., Nevskaya N. A., Jordanov St., Shepel E. N., Miroshnikov A. I., Ivanov V. T. // Bioorgan. Chem. 1980, V. 9. № 1. P. 124–151.
19. Kumar A., Ernst R. R., Wüthrich K. // Biochem. and Biophys. Res. Commun. 1980. V. 95. № 1. P. 1–6.
20. Kumar A., Wagner G., Ernst R. R., Wüthrich K. // J. Amer. Chem. Soc. 1981. V. 103. № 13. P. 3654–3658.
21. Momany F. A., McGuire R., Burgess A. W., Sheraga H. A. // J. Phys. Chem. 1975. V. 79. № 22. P. 2361–2381.
22. Nemethy F. A., Pottle M. S., Sheraga H. A. // J. Phys. Chem. 1983. V. 87. № 11. P. 1883–1887.
23. Wüthrich K., Billeter M., Braun W. // J. Mol. Biol. 1984. V. 180. № 3. P. 715–740.
24. Wüthrich K., Wieder G., Wagner G., Braun W. // J. Mol. Biol. 1982. V. 155. № 3. P. 311–319.
25. Арсеньев А. С., Кондаков В. И., Майоров В. Н., Волкова Т. Н., Гришин Е. В., Быстров В. Ф., Овчинников Ю. А. // Биоорган. химия. 1983. Т. 9. № 12. С. 768–793.
26. Tuchsien E., Woodward C. // J. Mol. Biol. 1985. V. 185. № 2. P. 421–430.
27. Ramachandran I. R. // Biochemistry. 1963. V. 2. № 5. P. 1138–1142.
28. Marion D., Wüthrich K. // Biochem. and Biophys. Res. Commun. 1983. V. 113. № 3. P. 967–974.
29. Otting G., Widmer H., Wagner G., Wüthrich K. // J. Magn. Reson. 1986. V. 66. № 1. P. 187–193.
30. Vax A., Davis D. G. // J. Magn. Reson. 1985. V. 65. № 2. P. 355–360.
31. Wagner G., Wüthrich K. // J. Mol. Biol. 1982. V. 160. № 2. P. 343–361.

Поступила в редакцию
28.IV.1987

SPATIAL STRUCTURES OF GRAMICIDIN A IN ORGANIC SOLVENTS. ¹H-NMR ANALYSIS OF FOUR SPECIES IN ETHANOL

BARSUKOV I. L., ARSENIYEV A. S., BYSTROV V. F.

*M. M. Shemyakin Institute of Bioorganic Chemistry, Academy
of Sciences of the USSR, Moscow*

Structural features of double helices formed by polypeptides with alternating *L*- and *D*-amino acid residues were analysed. It was found that the map of short distances (<4 Å) between protons of the two backbones is unique for each double helix type and even its fragment implies unambiguously parameters of the helix (i. e. parallel or antiparallel, handedness, pitch of helix, relative shift of polypeptide chains).

By analysis of two-dimensional ¹H-NMR spectra (COSY, RELSY, HOHAHA, NOESY), proton resonances of [Val¹]gramicidin A (GA) in the ethanol solution were assigned. The results obtained show that the solution contains five stable conformations of GA in comparable concentrations. Monomer of GA is in a random coil conformation. Specific maps of short interproton distances for the other four species (1–4) were obtained by means of two dimensional nuclear Overhauser effect spectroscopy. The maps as well as spin-spin couplings of the H–NC^α–H protons and solvent accessibilities of the individual amide groups correspond to four types of double helices $\pi\pi_{LD}^{5,6}$ with 5.6 residues per turn. The double helices are related to the Veatch species 1–4 of G \bar{A} . Species 1 and 2 are left-handed parallel double helices $\uparrow\uparrow\pi\pi_{LD}^{5,6}$ with different relative shift of polypeptide chains. Species 3 is a left-handed antiparallel double helix $\uparrow\downarrow\pi\pi_{LD}^{5,6}$ and species 4 is a right-handed parallel double helix $\uparrow\uparrow\pi\pi_{LD}^{5,6}$. In the dimers helices are fixed by the maximum number (28) of interbackbone hydrogen bonds NH...O=C possible for these structures. Species 1, 3 and 4 have C₂ symmetry axes. Relationship between gramicidin A spatial structures induced by various media is discussed.