



УДК 577.322.4.088.5:543.422.25

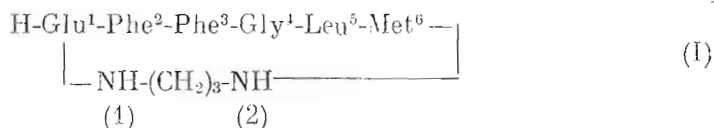
**ОПРЕДЕЛЕНИЕ МЕЖПРОТОННЫХ РАССТОЯНИЙ В ПЕПТИДАХ МЕТОДОМ ДВУМЕРНОЙ СПЕКТРОСКОПИИ ЯДЕРНОГО ЭФФЕКТА ОВЕРХАУЗЕРА (NOESY). КОНФОРМАЦИЯ ЦИКЛИЧЕСКОГО АНАЛОГА «ВЕЩЕСТВА P» В РАСТВОРЕ**

*Саулитис Ю. В., Лиениньш Э. Э.*

*Институт органического синтеза Академии наук ЛатвССР, Рига*

Разработан метод количественной оценки межпротонных расстояний в пептидах в растворе из NOESY-спектров. Метод основан на измерении интенсивностей кросс-пиков ядерного эффекта Оверхаузера (ЯЭО) в NOESY-спектрах. Показано, что отношения интенсивностей  $I_{Na}/I_{\alpha N}$  и  $I_{NN}/I_{\alpha N}$  позволяют найти соответствующие межпротонные расстояния  $d_{Na}$ ,  $d_{\alpha N}$  и  $d_{NN}$ . Эти расстояния использованы для определения остальных межпротонных расстояний, имеющих кросс-пики ЯЭО в NOESY-спектре. В качестве примера определены межпротонные расстояния и установлена пространственная структура для циклического гексапептида — циклического аналога вещества P — cyclo[II-Glu-Phe-Phe-Gly-Leu-Met-NH(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>-NH-] в растворе (CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>SO.

В последнее время развитие двумерных (2D) методов ЯМР открыло новые возможности в исследовании пространственной структуры белков [1–4] и пептидов [5–7] в растворе. Важное место здесь занимает метод 2D-спектроскопии ядерного эффекта Оверхаузера (NOESY). Между пространственно сближенными протонами в NOESY-спектрах наблюдаются кросс-пики ядерного эффекта Оверхаузера (ЯЭО) [8]. При нахождении пространственной структуры пептидных молекул до сих пор используется главным образом полуквантитативный анализ характерных кросс-пиков ЯЭО в NOESY-спектрах. Наличие кросс-пика рассматривается как свидетельство того, что соответствующие межпротонные расстояния находятся в интервале 2–4,5 Å [3]. Установленные таким образом интервалы допустимых межпротонных расстояний применяются для определения конформации молекулы. Более точно конформацию молекулы можно установить, используя количественную оценку межпротонных расстояний. Однако методы определения межпротонных расстояний из NOESY-спектров до сих пор разработаны недостаточно. В настоящей работе предлагается метод количественной оценки межпротонных расстояний в пептидах и белках, основанный на измерении интенсивностей кросс-пиков ЯЭО в NOESY-спектрах. Практическое применение показано определением межпротонных расстояний в циклическом аналоге вещества P — циклопептиде (I) [9]:



в растворе (CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>SO. На основе полученных межпротонных расстояний с учетом измеренных КССВ  $^3J_{\text{HNC}\alpha\text{H}}$  и температурных коэффициентов амидных протонов определена пространственная структура циклопептида (I) в растворе (CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>SO.

Двумерные NOESY-спектры получают с помощью последовательности трех селективных 90-градусных импульсов [8]:

$$90^\circ - t_1 - 90^\circ - \tau_m - 90^\circ - t_2,$$

где  $t_1$  — период эволюции, во время которого компоненты намагниченности частотно метаются,  $t_2$  — период наблюдения сигнала,  $\tau_m$  — время смешивания

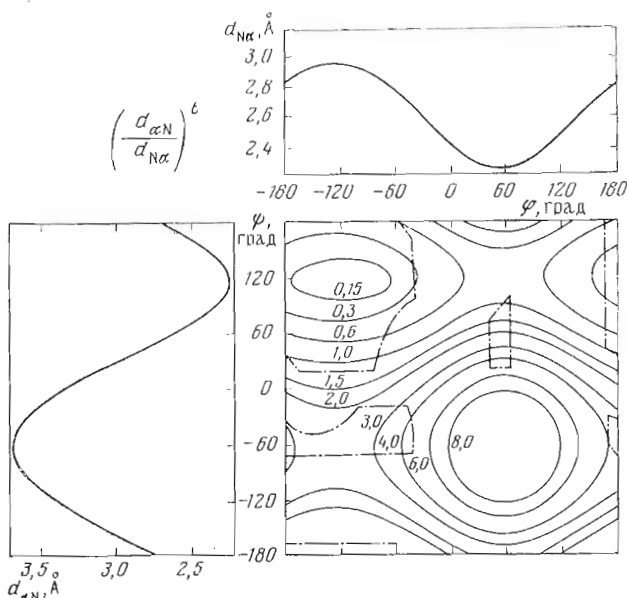


Рис. 1. Карта  $\varphi$ ,  $\psi$  с контурами фиксированных значений отношений межпротонных расстояний  $(d_{\alpha N}/d_{N\alpha})^6$ . Стерически разрешенные области обозначены для остатка  $\Delta a$  [14, 15] штрихпунктирной линией. В верхней и левой частях рисунка показаны зависимости  $d_{N\alpha}$  от  $\varphi$  и  $d_{\alpha N}$  от  $\psi$

компонентов намагниченности, в течение которого кросс-релаксация приводит к некогерентному обмену намагниченностей. Поэтому интенсивности кросс-пигов в спектрах зависят от величины  $\tau_m$ . Это было показано как теоретически [8, 10–12], так и в ряде работ [12, 13] экспериментально. Зависимость интенсивности кросс-пигов от  $\tau_m$  в случае многоспиновых систем весьма сложна, однако для практического приложения важно, что она имеет линейный участок при малых  $\tau_m$ .

В линейной области интегральные интенсивности кросс-пигов ЯЭО  $I_{ij}$  обратно пропорциональны шестой степени межпротонного расстояния  $d_{ij}$  [10, 12]:

$$I_{ij}(\tau_m) \approx f(\tau_{ij}) \frac{1}{d_{ij}^6} \cdot \tau_m \cdot M_{oi}, \quad (1)$$

где  $M_{oi}$  — равновесная намагниченность протона,  $f(\tau_{ij})/d_{ij}^6$  — скорость кросс-релаксации,  $f(\tau_{ij})$  — функция от времени корреляции  $\tau_{ij}$  для диполь-дипольного взаимодействия между протонами  $i$  и  $j$ .

Поскольку равновесные намагниченности протонов в одной молекуле одинаковы, для двух пар протонов  $k, l$  и  $i, j$  в области линейной зависимости интенсивностей кросс-пигов от  $\tau_m$  справедливо соотношение

$$\frac{I_{kl}(\tau_m)}{I_{ij}(\tau_m)} = \frac{d_{kl}^{-6}}{d_{ij}^{-6}} \quad (2)$$

при условии, что времена корреляции для пар протонов  $k, l$  и  $i, j$  мало различаются. Выражение (2) позволяет, если известно расстояние  $d_{ij}$ , найти  $d_{kl}$  из измеренных интенсивностей кросс-пигов ЯЭО.

В белково-пептидных молекулах в качестве известного расстояния можно использовать расстояние между геминальными метиленовыми протонами (например,  $\alpha$ -протоны глицина,  $\beta$ -,  $\gamma$ -,  $\delta$ -протоны пролина). Однако такой выбор связан с рядом экспериментальных неудобств. Во-первых, кросс-пики, соответствующие ЯЭО между геминальными протонами, не всегда разрешимы из-за небольшого различия в их химических сдвигах. Во-вторых, линейная область в выражении зависимости интенсивности

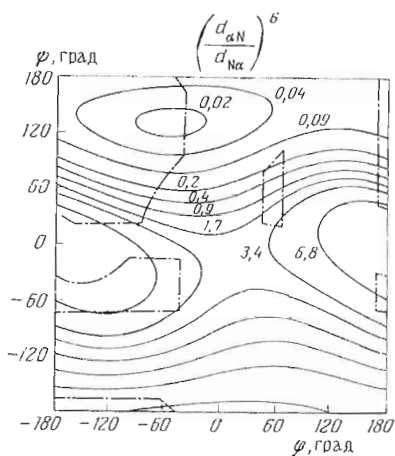


Рис. 2. Карта  $\varphi, \psi$  с контурами фиксированных значений отношений межпротонных расстояний  $(d_{\alpha N} / d_{NN})^6$

предыдущего аминокислотного остатка, соответствующие межпротонным расстояниям  $d_{\alpha N}$  и  $d_{NN}$  [2]. По аналогии обозначим расстояние между протонами NH и  $C^{\alpha}H$  одного и того же аминокислотного остатка  $d_{N\alpha}$ .

Указанные расстояния зависят от одного или обоих углов внутреннего вращения  $\varphi, \psi$  остова  $i$ -го остатка:

$$d_{N\alpha} = d_{N\alpha}(\varphi),$$

$$d_{\alpha N} = d_{\alpha N}(\psi),$$

$$d_{NN} = d_{NN}(\varphi, \psi).$$

Аналитические зависимости межпротонных расстояний  $d_{N\alpha}$ ,  $d_{\alpha N}$  и  $d_{NN}$  от углов  $\varphi, \psi$  получены Биллетером с соавторами и представлены в работе [3] (см. также рис. 1). Используя уравнение (2), можно составить систему уравнений:

$$\left. \begin{aligned} \frac{I_{N\alpha}}{I_{\alpha N}} &= \frac{d_{\alpha N}^6(\psi)}{d_{N\alpha}^6(\varphi)} \\ \frac{I_{NN}}{I_{\alpha N}} &= \frac{d_{\alpha N}^6(\psi)}{d_{NN}^6(\varphi, \psi)} \end{aligned} \right\} \quad (3)$$

и решить ее относительно  $d_{N\alpha}$ ,  $d_{\alpha N}$  и  $d_{NN}$ . Решение удобно находить из  $\varphi, \psi$ -карт отношений  $d_{\alpha N}^6 / d_{N\alpha}^6$  и  $d_{\alpha N}^6 / d_{NN}^6$ , представленных на рис. 1 и 2. Область пересечения контуров обеих карт даст оценку углов  $\varphi$  и  $\psi$ , удовлетворяющих экспериментальным значениям отношений  $I_{N\alpha} / I_{\alpha N}$  и  $I_{NN} / I_{\alpha N}$ , и соответствующие межпротонные расстояния могут быть найдены из зависимости этих расстояний от углов  $\varphi$  и  $\psi$ .

Из рис. 1 и 2 видно, что в общем случае система (3) может не иметь решений или иметь более одного решения. В случае нескольких решений можно выбрать стерически допустимые значения  $\varphi, \psi$ , используя в качестве дополнительного критерия разрешенные области на контактных картах Рамачандрана [11]. Очевидно, что правильное решение для  $\varphi$  и  $\psi$  будет находиться в области, близкой к минимуму энергий на этих картах. Как дополнительный критерий также можно использовать зависимость КССВ вицинальных протонов  $^3J_{\text{HNC}\alpha\text{H}}$  от двугранного угла  $\varphi$  [16]. Отсутствие решений или их локализация в областях стерически запрещенных конформаций свидетельствует о том, что у данного аминокислотного остатка нет одной стабильной конформации. Если удовлетворительное решение

кросс-пиков от  $\tau_m$  для гемипальных протонов примерно в 4 раза меньше, чем, например, для максимально приближенных протонов  $N_1H$  и  $C^{\alpha}H$  (2,2 Å), что вынуждает работать с низкими интенсивностями кросс-пиков в NOESY-спектрах. В качестве известных расстояний можно также использовать межпротонные расстояния в боковых цепях аминокислотных остатков, например в остатке Phe расстояние между соседними протонами ароматического кольца 2,5 Å. Однако такой выбор возможен при условии, если соответствующие кросс-пики ЯЭО разрешимы и времена корреляции движения боковой цепи и остова мало различаются.

Мы предлагаем иной метод оценки межпротонных расстояний в пептидах и белках. В этих соединениях обычно наблюдаются ЯЭО между протонами  $i$ -го остатка и протонами  $C^{\alpha}H$  и/или  $NH$

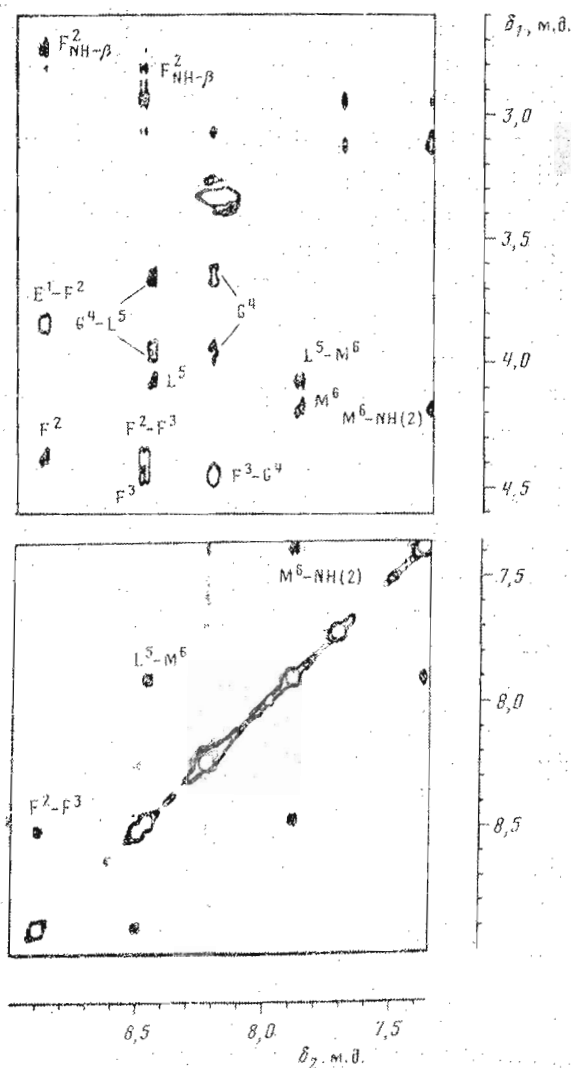


Рис. 3. Спектральные области фазоизбирательного NOESY-спектра  $\delta_1$ ,  $\delta_2$  7,35–9,0 м.д. (а) и  $\delta_1$  2,6–4,6 м.д.,  $\delta_2$  7,35–9,0 м.д. (б). Показаны кросс-пики ЯЭО, соответствующие межпротонным расстояниям  $d_{N\alpha}$ ,  $d_{\alpha N}$  и  $d_{NN}$ . Использован однобуквенный код обозначения аминокислотных остатков: Glu – E, Phe – F, Leu – L, Met – M, Gly – G. NH- $\beta$  – кросс-пики ЯЭО между протонами NH и C $^{\beta}$  H; M $^6$  – NH(2) – кросс-пик ЯЭО между протонами C $^{\alpha}$ H остатка Met $^6$  и NH(2)

найден для одного остатка, одно из полученных расстояний может быть принято как «эталонное» в уравнении (2) для расчета других расстояний.

Предлагаемый метод определения межпротонных расстояний  $d_{N\alpha}$ ,  $d_{\alpha N}$  и  $d_{NN}$  ограничивается теми аминокислотными остатками, для которых три соответствующих кросс-пика ЯЭО разрешены и достаточно интенсивны для количественной оценки. Из подробного анализа межпротонных расстояний во вторичных структурах белково-пептидных молекул, сделанного Вутрыхом с соавт. [2, 3], следует, что такая ситуация возможна. Из рис. 1 видно, что  $d_{N\alpha} = 2,85 \pm 0,05$  Å в области  $\varphi = -60^\circ \div -180^\circ$ , т. е. практически постоянно. Это обстоятельство может быть использовано двойко: как для проверки предлагаемого метода, так и для оценки межпротонных расстояний из соотношения (2).

Предложенный выше метод применим для конформационно жестких белково-пептидных молекул или их участков, т. е. если межпротонные расстояния  $d_{N\alpha}$ ,  $d_{\alpha N}$  и  $d_{NN}$  постоянны, а соответствующие выражения  $f(\tau_{ij})$

мало различаются. В случае конформационной подвижности происходят внутренние переориентации отдельных участков молекулы, что приводит к различию  $f(\tau_{ij})$  и к изменению расстояний для разных пар протонов. Из формы функции  $f(\tau_{ij})$  [17] видно, что если ЯЭО отрицательный (это справедливо для пептидно-белковых молекул), то внутренние колебания с временем корреляции  $\tau_{ij}$  могут только понизить величину эффекта [18], т. е.  $f(\tau_{ij})/f(\tau_R) \leq 1$ , где  $\tau_R$  — время корреляции, соответствующее изотропному движению молекулы. Это приводит к усредненной скорости кросс-релаксации за время  $\tau_m$  в выражении (1) [18, 19]:

$$\left\langle \frac{f(\tau_{ij})}{d_{ij}^6} \right\rangle = f(\tau_{ij}) \cdot \left\langle \frac{1}{d_{ij}^6} \right\rangle, \quad (4)$$

где быстрые ( $\tau_{ij} \leq \tau_R$ ) внутренние движения учитываются в функции  $f(\tau_{ij})$ , а флуктуации межпротонного расстояния — в  $\left\langle \frac{1}{d_{ij}^6} \right\rangle$ , для более медленных колебаний ( $\tau_{ij} > \tau_R$ ) существенна только составляющая  $\left\langle \frac{1}{d_{ij}^6} \right\rangle$ .

Поэтому точная интерпретация интенсивностей кросс-пиков ЯЭО (впрочем, так же как химических сдвигов, КССВ, температурных коэффициентов и других ЯМР-параметров) возможна только для динамической модели пептидной молекулы, т. е. при наличии временных зависимостей конформационных параметров. Для относительно жестких белково-пептидных молекул или их участков (отсутствуют быстрые внутренние колебания и интервалы флуктуаций межпротонных расстояний невелики:  $\pm 0,2 \text{ \AA}$ ) применение предложенных методов определения межпротонных расстояний оправданно, поскольку динамика молекулярной структуры в таких системах не должна оказывать существенного влияния на результат.

Можно ожидать, что в пептидно-белковых молекулах в случае внутренних движений времена корреляции и вид функций существенно не различаются для дипольного взаимодействия между соседними протонами с  $d_{N\alpha}$ ,  $d_{\alpha N}$  и  $d_{NN}$ . Если это так, тогда, сопоставляя найденные межпротонные расстояния  $d_{N\alpha}$ ,  $d_{\alpha N}$  и  $d_{NN}$  и интенсивности соответствующих кросс-пиков ЯЭО для отдаленных участков белково-пептидной молекулы, можно судить об их относительной подвижности.

Рассмотренная методика нами использована для определения конформации циклопептида (I) в растворе  $(CD_3)_2SO$ . Отнесение сигналов протонов спиновых систем к отдельным аминокислотным остаткам

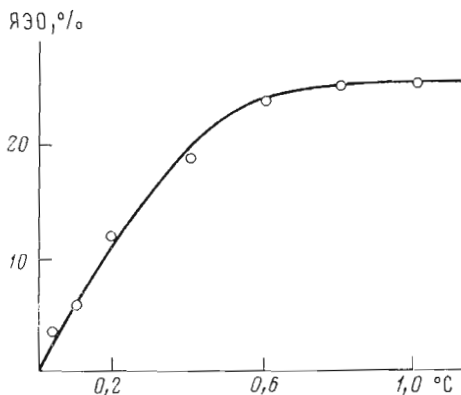


Рис. 4. Зависимость одномерного ЯЭО между геминальными протонами  $C^{\alpha}H_2$  остатка Gly<sup>4</sup> от времени насыщения  $t$

проведено анализом COSY-спектров. Далее по NOESY-спектру (см. рис. 3) сделано отнесение отдельных спиновых систем к конкретным аминокислотным остаткам. Измеренные химические сдвиги протонов, а также КССВ  $^3J_{HNC^{\alpha}H}$  и температурные коэффициенты амидных протонов представлены в табл. 1. Значения температурных коэффициентов амидных протонов, неэквивалентность химических сдвигов геминальных протонов остатка Gly<sup>2</sup> указывают на стабилизированную конформацию циклопептида (I).

Для определения межпротонных расстояний из NOESY-спектров сначала необходимо оценить  $\tau_m$ , при котором справедливо соотношение (1). Как показано в работах [20, 21], для этого удобно использовать одномерный ЯЭО. Зависимости величины одномерного ЯЭО от времени насы-

Параметры спектров <sup>1</sup>H-ЯМР аналога (I) в (CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>SO при T 303 K

Амино- кислот- ный остаток	δ, м. д.				<sup>3</sup> J <sub>HNC<sup>α</sup>H'</sub> Гц	(Δδ <sub>NH</sub> /ΔT) · ·10 <sup>3</sup> , м. д./K
	NH	C <sup>α</sup> H	C <sup>β</sup> H	другие протоны *		
Glu <sup>1</sup>		3,86	2,09; 1,94	C <sup>γ</sup> H <sub>2</sub> 2,24; 2,24		
Phe <sup>2</sup>	8,89	4,39	2,96; 2,75		8,3	1,3
Phe <sup>3</sup>	8,51	4,46	3,10; 2,89		7,9	4,8
Gly <sup>4</sup>	8,24	3,97; 3,66			5,4; 5,4	4,3
Leu <sup>5</sup>	8,47	4,09	1,57; 1,57	C <sup>γ</sup> H 1,67; C <sup>δ</sup> H <sub>3</sub> 0,91; 0,85	7,2	4,3
Met <sup>6</sup>	7,91	4,21	1,96; 1,96	C <sup>γ</sup> H <sub>2</sub> 2,47; 2,41; C <sup>δ</sup> H <sub>3</sub> 2,03	8,3	1,3

\* Химические сдвиги амидных протонов NH(1) и NH(2) 7,73 и 7,49 м. д., а температурные коэффициенты 2,5·10<sup>-3</sup> и 0,7·10<sup>-3</sup> м. д./K соответственно. Химические сдвиги пропилен-1,3-диаминовых метиленовых протонов —NH(1) —C<sup>α</sup>H<sub>2</sub> —C<sup>β</sup>H<sub>2</sub> —C<sup>γ</sup>H<sub>2</sub> —NH(2) — имеют следующие значения: C<sup>α</sup>H<sub>2</sub> 3,14; 2,95, C<sup>β</sup>H<sub>2</sub> 1,53; 1,53, C<sup>γ</sup>H<sub>2</sub> 3,14; 3,14 м. д.

Таблица 2

Интенсивность кросс-пиков NOESY-спектра, межпротонные расстояния, двугранные углы и KCCB <sup>3</sup>J<sub>HNC<sup>α</sup>H</sub> в молекуле (I) в растворе (CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>SO

Остаток	Межпротон- ные расстоя- ния	Интен- сивность, отн. ед.	d', Å *	d'', Å	Двугранные углы, град		Расчетное <sup>3</sup> J <sub>HNC<sup>α</sup>H</sub>
					φ	ψ	
Glu <sup>1</sup>	d <sub>αN</sub>	110		2,3		100	
Phe <sup>2</sup>	d <sub>Nα</sub>	38	2,8				
	d <sub>αN</sub>	128	2,3		-160	80	7,4
	d <sub>NN</sub>	40	2,8				
Phe <sup>3</sup>	d <sub>Nα</sub>	94		2,4			
	d <sub>αN</sub>	148		2,2	70	100	7,8
	d <sub>NN</sub>	0		3,3			
Phe <sup>4</sup>	d <sub>Nα</sub>	90, 100		2,4; 2,4; 2,5; 2,5	60	-120	Σ11,0
	d <sub>αN</sub>	72, 92					
	d <sub>NN</sub>	0		3,3			
Leu <sup>5</sup>	d <sub>Nα</sub>	30	2,9				
	d <sub>αN</sub>	62	2,6		-160	60	7,2
	d <sub>NN</sub>	61	2,6				
Met <sup>5</sup>	d <sub>Nα</sub>	71	2,4				
	d <sub>αN</sub>	35	2,8		80	50	7,8
	d <sub>NN</sub>	56	2,6				
Gly <sup>4</sup>	d <sub>C<sup>α</sup>H-C<sup>α</sup>H</sub>	470		1,8			

\* Ошибка определения d', d'' ≈ ±0,2 Å, φ и ψ = ±20°; объяснение обозначений d', d'' — см. текст.

щения и интенсивностей кросс-пиков ЯЭО в NOESY-спектрах от τ<sub>m</sub> по форме совпадают [21]. Это позволяет использовать зависимость величины одномерного ЯЭО от времени насыщения для оценки величины τ<sub>m</sub>, при которой еще справедливо линейное приближение (1). Нами установлено (рис. 4), что линейное приближение (1) справедливо при τ<sub>m</sub> ≤ 0,4 с. NOESY-спектр, полученный при τ<sub>m</sub> = 0,4 с, использовали для определения межпротонных расстояний d<sub>Nα</sub>, d<sub>αN</sub> и d<sub>NN</sub>. Измеренные интенсивности кросс-пиков ЯЭО приведены в табл. 2.

Для остатков Phe<sup>2</sup>, Leu<sup>5</sup> и Met<sup>6</sup> наблюдались кросс-лики, соответствующие межпротонным расстояниям d<sub>Nα</sub>, d<sub>αN</sub> и d<sub>NN</sub> (см. рис. 3), что позволило найти соответствующие углы φ, ψ и далее межпротонные расстояния (в табл. 2 расстояния d'). Для остатка Met<sup>6</sup> были найдены два решения со значениями углов φ = 80°, ψ = 50° и φ = -50°, ψ = 10° соответственно, но второе решение можно исключить по двум причинам. Во-первых, это энергетически невыгодная область на φ, ψ-карте (относительная энергия для остатка Met<sup>6</sup> в области φ = -50°, ψ = 10° на 83,8 кДж/моль выше, чем

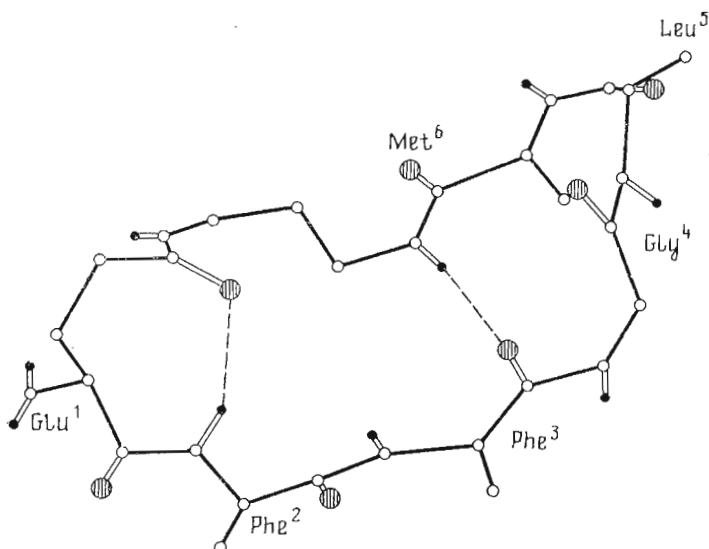


Рис. 5. Пространственная структура остова циклопептида (I) в растворе  $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$ , полученная из межпротонных расстояний  $d'$  и  $d''$  (см. табл. 2)

в области  $\varphi=80^\circ$ ,  $\psi=50^\circ$  [15]). Во-вторых, при значении двугранного угла  $\varphi=-50^\circ$  должно наблюдаться низкое значение  $^3J_{\text{HNC}^\alpha\text{H}}=3,3$  Гц. Экспериментально измеренная величина КССВ равна 8,3 Гц, что доказывает правильность решения, т. е.  $\varphi=80^\circ$ ,  $\psi=50^\circ$  для остатка  $\text{Met}^6$ . Для остатка  $\text{Phe}^3$  и  $\text{Gly}^4$  такую методику применить не удалось, поскольку ЯЭО, соответствующие межпротонным расстояниям  $d_{\text{NN}}$ , для этих остатков не наблюдались.

Межпротонные расстояния в остальных аминокислотных остатках определяли по соотношению (2), в котором в качестве «эталонных» использованы уже рассчитанные расстояния аминокислотных остатков, находящихся по возможности ближе к рассматриваемому остатку. Эти расстояния обозначены  $d''$  и приведены в табл. 2. Найденное этим способом расстояние между геминальными протонами остатка  $\text{Gly}^4$   $d_{\text{C}^\alpha\text{H}-\text{C}^\beta\text{H}}$  равно 1,8 Å, что прекрасно соответствует теоретическому расстоянию между геминальными протонами 1,75 Å. Таким образом, полученные результаты показывают практическую возможность количественной оценки межпротонных расстояний предложенной методикой в белково-пептидных молекулах из NOESY-спектров.

На основе полученных межпротонных расстояний можно построить пространственную структуру циклопептида (I) в растворе  $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$ . Найденная таким образом структура показана на рис. 5, соответствующие значения  $\varphi$ ,  $\psi$  отдельных аминокислотных остатков приведены в табл. 2. Эта структура характеризуется двумя внутримолекулярными водородными связями:  $\text{CO}(\text{Phe}^3)-\text{NH}(\text{Glu}^1)$  и  $\text{CO}(\text{Glu}^1)-\text{NH}(\text{Phe}^2)$ . С этим выводом хорошо согласуются низкие значения температурных коэффициентов амидных протонов  $\text{NH}(2)$  и  $\text{NH}(\text{Phe}^3)$  ( $0,7 \cdot 10^{-3}$  и  $1,3 \cdot 10^{-3}$  м.д./К).

Таким образом, предложенный выше метод дает однозначный вывод о пространственной структуре малых пептидов, которая хорошо согласуется с другими параметрами ЯМР ( $\Delta\delta_{\text{NH}}/\Delta T$ ,  $^3J_{\text{HNC}^\alpha\text{H}}$ ).

### ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Синтез циклопептида (I) описан в работе [9]. COSY-, NOESY-спектры получены на спектрометре Bruker WM-360 с рабочей частотой 360 МГц, оснащенный ЭВМ Aspect 2000. Спектры обрабатывали на автономной станции обработки данных, снабженной ЭВМ Aspect 1000. На этой же ЭВМ рассчитывали контурные карты, показанные на рис. 1 и 2. Спектры 0,045 М раствора циклопептида (I) в  $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$  получали в 5-мм ампуле при  $T$  303 К. Температурные коэффициенты амидных протонов определяли из спектров, снятых при  $T$  297, 303, 308, 313, 318, 323, 333 К. Для измерения одномерного ЯЭО выбирали мощность насыщения сигнала 40 Гц. Химические

сдвиги сигналов в спектрах  $^1\text{H}$ -ЯМР измерены относительно тетраметилсилана с точностью  $\pm 0,01$  м.д. Точность измерения  $KCCB \pm 0,5$  Гц, ошибка определения  $\Delta\delta_{\text{NH}}/\Delta T$  10%. COSY-спектр получали в абсолютном виде [22] с шириной 4000 Гц в направлениях F1 и F2, что соответствовало, после двумерного преобразования Фурье, разрешению 7,8 Гц на точку. Квадратурное детектирование применялось в направлениях F1 и F2, для чего фазы 90-градусных импульсов и приемника менялись, как описано в работе [23]. Перед преобразованием Фурье данные умножались на колоколообразные функции  $\sin$  и  $\sin^2$  в направлениях F1 и F2.

NOESY-спектр снимали в фазоизбирательном виде с квадратурным детектированием и шириной спектров 4000 Гц в направлениях F1 и F2 [24–26], для чего фазы 90-градусных импульсов и приемника менялись, как описано в работе [23].

В экспериментах COSY и NOESY перед началом очередной серии импульсов следовал временной интервал 1,6 и 2,1 с соответственно для достижения равновесного состояния ядерной намагниченности. Матрица данных фазоизбирательного NOESY-спектра  $2048 \times 800$  дополнялась нулями в направлении F1 до размерности  $2048 \times 2048$ , что после Фурье-преобразования соответствует разрешению 3,9 Гц на точку. Преобразование Фурье всех 2D-спектров проводили с помощью программы Bruker DISNMRP, версия 840301.1. Стандартная программа 2D-спектров не позволяет непосредственно находить интегральную интенсивность кросс-пиков, поэтому мы ввели аппроксимацию, согласно которой интегральная интенсивность кросс-пиков в NOESY-спектре рассчитывалась как произведение высоты пика на площадь контура пика на полувысоте. Высоту кросс-пиков измеряли из сечений в направлении F2. Площадь на полувысоте кросс-пика определяли планиметрически из NOESY-спектра в контурном представлении.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Wagner G., Kumar A., Wüthrich K. Eur. J. Biochem., 1981, v. 114, № 2, p. 375–384.
2. Wüthrich K., Billeter M., Braun W. J. Mol. Biol., 1984, v. 180, № 2, p. 715–740.
3. Billeter M., Braun W., Wüthrich K. J. Mol. Biol., 1982, v. 155, № 3, p. 321–346.
4. Быстров В. Ф. Биоорганич. химия, 1984, т. 10, № 8, с. 997–1048.
5. Kessler H., Bermel W., Friedrich A., Krach B., Hull W. E. J. Amer. Chem. Soc., 1982, v. 104, № 23, p. 6297–6304.
6. Саулитис Ю. Б., Лиспиньш Э. Э., Секацис И. П., Шендерович М. Д., Мугулис Ф. К., Мугуле И. Э., Чупенс Г. И. Биоорганич. химия, 1985, т. 11, № 8, с. 1013–1025.
7. Bruch M. D., Noggle J. H., Gierasch L. M. J. Amer. Chem. Soc., 1985, v. 107, № 5, p. 1400–1407.
8. Jeener J., Meier B. H., Bachman P., Ernst R. R. J. Chem. Phys., 1979, v. 71, № 11, p. 4546–4553.
9. Мугулис Ф. К., Мугуле И. Э., Мауронс Г. Х., Секацис И. П., Григорьева В. Д., Кукайтис Э. М., Голубева В. В., Мышлякова Н. В., Клуша В. Е., Чупенс Г. И. Биоорганич. химия, 1985, т. 11, № 9, с. 1276–1278.
10. Macura S., Ernst R. R. Mol. Phys., 1980, v. 41, № 1, p. 95–117.
11. Keepers J. W., James T. J. J. Magn. Reson., 1984, v. 57, № 3, p. 404–426.
12. Macura S., Wüthrich K., Ernst R. R. J. Magn. Reson., 1982, v. 47, № 2, p. 351–357.
13. Kumar A., Wagner G., Ernst R. R., Wüthrich K. J. Amer. Chem. Soc., 1981, v. 103, № 13, p. 3654–3658.
14. Ramachandran G. N., Sasisekharan V. Adv. Protein Chem., 1968, v. 23, № 2, p. 283–437.
15. Peters D., Peters J. J. Mol. Struct., 1984, v. 109, № 1/2, p. 137–148.
16. Bystrov V. F. Progr. NMR Spectrosc., 1976, v. 10, p. 41–81.
17. Woessner D. E., Snowden B. S., Meyer G. H. J. Chem. Phys., 1969, v. 50, № 2, p. 719–721.
18. Noggle J. H., Schirmer R. E. The nuclear Overhauser effect. N. Y.: Acad. Press, 1971, p. 44–76.
19. Tropp J. J. Chem. Phys., 1980, v. 72, № 11, p. 6035–6043.
20. Dobson C. M., Olejniczak E. T., Poulsen F. M., Ratcliff R. G. J. Magn. Reson., 1982, v. 48, № 1, p. 97–110.
21. Clore G. M., Gronenborn A. M. J. Magn. Reson., 1985, v. 61, № 1, p. 158–164.
22. Aue W. P., Bartholdi E., Ernst R. R. J. Chem. Phys., 1976, v. 64, № 5, p. 2229–2246.
23. Bodenhausen G., Kogler H., Ernst R. R. J. Magn. Reson., 1984, v. 58, № 2, p. 370–388.
24. States D. J., Haberkorn R. A., Ruben D. J. J. Magn. Reson., 1982, v. 48, № 2, p. 286–292.
25. Marion D., Wüthrich K. Biochem. and Biophys. Res. Commun., 1983, v. 113, № 3, p. 967–974.
26. Olejniczak E. T., Hoch J. C., Dobson C. M., Poulsen F. M. J. Magn. Reson., 1985, v. 64, № 1, p. 199–206.

Поступила в редакцию  
26.V.1986



QUANTITATIVE EVALUATION OF INTERPROTON DISTANCES IN PEPTIDES  
BY TWO-DIMENSIONAL NUCLEAR OVERHAUSER EFFECT SPECTROSCOPY.  
THE CONFORMATION OF A CYCLIC ANALOGUE OF SUBSTANCE P IN SOLUTION

SAULITIS J., LIEPINS E.

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

Quantitative method is developed for evaluation interproton distances in peptides in solution. The method is based on the measurement of the relative intensities of the cross-peaks in the pure-phase absorption NOESY spectra. The ratios of the cross-peak intensities  $I_{N\alpha}/I_{\alpha N}$  and  $I_{NN}/I_{\alpha N}$  enable to determine the corresponding interproton distances  $d_{N\alpha}$ ,  $d_{\alpha N}$  and  $d_{NN}$  for several amino acid residues. These distances can be used to estimate other distances with cross-peaks in NOESY spectra. As example, the interproton distances are determined in a cyclic hexapeptide, namely cyclic analogue of substance P: cyclo[H-Glu-Phe-Phe-Gly-Leu-Met-NH(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>-NH-]. The spatial structure of the molecule in dimethylsulphoxide solution is established.