



УДК 547.962 : 541.63

КОНФОРМАЦИОННО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ОТНОШЕНИЯ des-Arg⁹-БРАДИКИНИНА

I. КОНФОРМАЦИИ МОЛЕКУЛЫ В РАСТВОРЕ

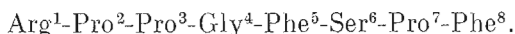
*Шендерович М. Д.**Институт органического синтеза Академии наук Латвии, Рига*

Методами теоретического конформационного анализа исследована пространственная структура des-Arg⁹-брадикинина (ДАБК) — селективного антагониста кининовых рецепторов типа В₁. Для ограничения круга рассматриваемых конформаций использованы литературные данные ¹H-ЯМР в растворе (CD₃)₂SO, указывающие на взаимодействие С-концевой карбоксильной группы ДАБК с гуанидиновой группой Arg¹ и гидроксильной группой Ser⁶. Полученный набор низкоэнергетических конформаций ДАБК сопоставлен с данными ¹H-ЯМР. Выделены четыре типа конформаций, согласующихся с экспериментальными данными, т. е. являющихся стерически состоятельными моделями предпочтительной пространственной структуры ДАБК в (CD₃)₂SO.

Обширными структурно-функциональными исследованиями аналогов и гомологов пептидного биорегулятора брадикинина (БК) было доказано существование двух типов рецепторов кининов в гладкомышечных тканях [1, 2]. В матке крысы, сонной артерии собаки, яремной вене кролика и многих других тканях преобладают рецепторы типа В₂, наиболее активными агонистами которых являются природные кинины. Обнаруженные в аорте и некоторых других тканях сосудов рецепторы типа В₁ имеют более высокое сродство к des-Arg⁹-брадикинину (ДАБК).

Рецепторы В₁ и В₂ проявляют асимметричную специфичность по отношению к аналогам БК и ДАБК: аналоги и антагонисты ДАБК практически неактивны в тканях с рецепторами В₂, в то же время БК сохраняет заметное сродство к рецепторам В₁ [2, 3]. На последнем факте базировалась предпринятая ранее попытка определения одной из биологически активных конформаций БК [4] путем сопоставления низкоэнергетических конформаций трех агонистов рецепторов В₁: БК, ДАБК и [D¹Phe⁸]ДАБК. Однако недавние эксперименты [5, 6] доказывают, что сродство БК и его аналогов к рецепторам В₁ — кажущееся, обусловленное их превращением под действием карбоксипептидаз в des-Arg-производные. Рецепторы типа В₁ являются, таким образом, специфическими рецепторами ДАБК.

Настоящая серия работ посвящена исследованию пространственной структуры и конформационно-функциональных отношений des-Arg⁹-брадикинина, селективного агониста рецепторов типа В₁ с аминокислотной последовательностью:



В этой статье на основании данных ¹H-ЯМР, полученных С. Ферманджаном с соавт. [7], и результатов теоретического конформационного анализа с помощью предложенной ранее методики определения пространственной структуры пептидов в растворе [8, 9] сделана попытка выделить наиболее вероятные конформации ДАБК в диметилсульфоксиде.

Данные спектроскопии ¹H-ЯМР и конформационные ограничения. Молекулы des-Arg⁹-брадикинина и его аналогов [Alaⁿ]ДАБК (n = 1, 8) детально исследованы в работе [7] методами одномерной спектроскопии ¹H-ЯМР в воде и диметилсульфоксиде. Слабое разделение сигналов геминальных α- и β-протонов свидетельствует о конформационной лабильности молекулы ДАБК в H₂O. Параметры ЯМР указывают, одна-

Сокращения: БК — брадикинин, ДАБК — des-Arg⁹-брадикинин.

ко, на стабилизацию пространственной структуры в цвиттер-ионном состоянии молекулы ДАБК в $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$. Так, неэквивалентность α -протонов Gly^4 в зависимости от pH составляет в H_2O 0,07—0,1 м.д., а в $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$ для катионного состояния 0,17 м.д. и для цвиттер-ионного состояния 0,57 м.д. При переходе от катионного к цвиттер-ионному состоянию молекулы ДАБК в $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$ температурные коэффициенты $\Delta\delta/\Delta T$ амидных протонов Phe^5 и Ser^6 изменяются незначительно, а их величины свидетельствуют о доступности этих протонов растворителю. Температурные коэффициенты амидных протонов Gly^4 и Phe^8 , напротив, снижаются по абсолютной величине в цвиттер-ионном состоянии до значений $1,73 \cdot 10^{-3}$ и 0 м.д./К, характерных для протонов, экранированных от растворителя [10, 11]. Наконец, отсутствие минорных компонент в спектрах ^1H -ЯМР свидетельствует о *транс*-конформации всех пептидных связей в ДАБК.

Таким образом, молекула ДАБК (здесь и далее, если не оговорено особо, речь идет о цвиттер-ионном состоянии) обладает в $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$ ограниченным набором конформаций. Роль различных функциональных групп молекулы в стабилизации пространственной структуры ДАБК может быть оценена при сопоставлении параметров ЯМР ДАБК и его $[\text{Ala}^n]$ аналогов [7].

Параметры ЯМР катионного и цвиттер-ионного состояний аналога $[\text{Ala}^1]\text{ДАБК}$ близки между собой и к параметрам катионной формы ДАБК, но существенно отличаются от характеристик цвиттер-ионной формы ДАБК. Так, у $[\text{Ala}^1]\text{ДАБК}$ значительно возрастают по абсолютной величине температурные коэффициенты амидных протонов Gly^4 и Phe^8 , причем $\Delta\delta/\Delta T$ $\text{NH}(\text{Phe}^8)$ становится положительным. Иными словами, удаление гуанидиновой группы аргинина и нейтрализация С-концевого карбоксила ДАБК приводят к одинаковому результату: пространственная структура молекулы в $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$ становится более лабильной. Таким образом, весьма вероятно, что ионные взаимодействия гуанидиновой и карбоксильной групп — важный фактор стабилизации пространственной структуры ДАБК в $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$.

Замена пролинов в положениях 2 и 3 на аланин приводят к существенным различным результатам: $[\text{Ala}^3]\text{ДАБК}$ по наблюдаемым параметрам ЯМР напоминает ДАБК, а $[\text{Ala}^2]\text{ДАБК}$ — аналог $[\text{Ala}^1]\text{ДАБК}$. Замена в конформационно жестком N-концевом трипептиде Arg-Pro-Pro центрального пролина аланином снимает стерические ограничения, и для аналога $[\text{Ala}^2]\text{ДАБК}$ конформационная подвижность, по-видимому, оказывается предпочтительнее, чем фиксация пространственной структуры за счет электростатического взаимодействия гуанидиновой группы аргинина с С-концевым карбоксилем. Аналогичный эффект наблюдался при замене Pro \rightarrow Ala в трипептиде $\text{Lys}^+-\text{Phe}-\text{Ala}-\text{Pro}-\text{COO}^-$ [12].

Замена серина в положении 6 на аланин изменяет главным образом ЯМР-характеристики остатка Phe^8 , а параметры ЯМР аналогов $[\text{Ala}^7]-\text{ДАБК}$ и $[\text{Ala}^8]\text{ДАБК}$ качественно сходны с наблюдаемыми для ДАБК. Смещение сигналов β -протонов и снижение вицинальной константы $^3J_{\text{HNC}^{\alpha}\text{H}}$ остатка Phe^8 аналога $[\text{Ala}^6]\text{ДАБК}$ свидетельствуют о влиянии боковой цепи серина на конформацию С-концевого фенилаланина ДАБК, а вицинальные константы $^3J_{\text{HNC}^{\alpha}\text{Ser}^6\text{H}}$ остатка Ser^6 — о необычном распределении ротамеров боковой цепи серина. Все эти данные позволяют предположить, что пространственная структура С-концевого участка молекулы ДАБК в $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$ дополнительно стабилизирована взаимодействием боковой цепи Ser^6 и С-концевого карбоксила с образованием внутримолекулярной водородной связи.

Итак, данные ^1H -ЯМР [7] в общих чертах свидетельствуют об ограниченном наборе предпочтительных конформаций молекулы ДАБК в $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$, большинство из которых должно удовлетворять следующим ограничениям: 1) сближение гуанидиновой группы Arg¹ и С-концевой карбоксильной группы с вероятным образованием солевого мостика; 2) водородная связь между группой OH Ser^6 и С-концевой карбоксильной группой.

Наиболее вероятные конформации остова отдельных аминокислотных остатков ДАБК в $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$

Остаток	Наиболее вероятные конформации *	Основания для ограничения
Arg ¹	<i>F</i>	Стерические ограничения **, симметрия группы NH_3^+
Pro ²	<i>F</i>	Стерические ограничения **
Pro ³	<i>A, C</i>	Низкий $\Delta\delta/\Delta T$ NH Gly ⁴
Gly ⁴	<i>A, A*, C, C*, F, F*</i>	$^3J_{\text{HNC}\alpha\text{H}}$ Gly ⁴
Phe ⁵	<i>A, D, E, F</i>	$^3J_{\text{HNC}\alpha\text{H}}$ Phe ⁵ высокий $\Delta\delta/\Delta T$ NH (Ser ⁶)
Ser ⁶	<i>A*, D, E, F</i>	Стерические ограничения **
Pro ⁷	<i>A(B)</i> }	Низкий $\Delta\delta/\Delta T$ NH (Phe ⁸), водородная связь
Phe ⁸	<i>E</i> }	(Ser ⁶)OH...-OOC

* Однобуквенные обозначения конформаций остова см. в [13].

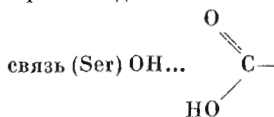
** Круг стерически разрешенных конформаций остатка, предшествующего пролину, ограничен влиянием пирролидинового кольца.

Наблюдаемые величины $\Delta\delta_{\text{NH}}/\Delta T$ и $^3J_{\text{HNC}\alpha\text{H}}$ позволяют также наложить более детальные ограничения на конформации остова остатков 3—6 ДАБК. В соответствии с обычными критериями [10, 11] маловероятно участие NH(Ser⁶) ($\Delta\delta/\Delta T = 7,6 \cdot 10^{-3}$ м.д./К) во внутримолекулярных водородных связях, ожидаемых, например, в случае β -изгиба 3—6 или γ -изгиба 4—6. Это в свою очередь исключает образование водородной связи (Gly⁴)NH...OC(Ser⁶). Из числа возможных акцепторов водородной связи NH(Gly⁴) группы CO остатков Arg¹ и Pro⁷ (β -изгибы 1—4 и 4—7) исключаются по стерическим соображениям, а С-концевая карбоксильная группа, согласно сделанным предположениям, насыщена другими взаимодействиями. Таким образом, наиболее вероятные причины низкого температурного коэффициента NH(Gly⁴) — водородная связь с CO(Pro²) (конформация *C* остатка Pro³ по классификации [13]) или экранировка ближайшим окружением без образования водородной связи. Расчет доступной растворителю поверхности амидного протона (см. ниже) остатка, следующего за пролином, показывает, что при конформациях пролина типа *A* этот протон экранирован от растворителя пирролидиновым кольцом, а при конформациях типа *F* обычно доступен растворителю. Таким образом, конформации Pro³ типа *F* ($\psi \simeq 150^\circ$) могут быть исключены из рассмотрения при поиске наиболее вероятных конформаций ДАБК в $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$.

Видиальные константы $^3J_{\text{HNC}\alpha\text{H}}$ Gly⁴ (4,4 и 6,6 Гц) соответствуют углам $\varphi \simeq \pm 60^\circ$, что ограничивает конформации Gly⁴ в ДАБК парами симметричных областей *F* и *F**, *C* и *C**, *A* и *A**. Высокая видиальная константа $^3J_{\text{HNC}\alpha\text{H}}$ Phe⁵ (8,6 Гц) соответствует области изменения угла $\varphi = -120 \pm 30^\circ$. Полученные в этом и следующем разделах ограничения для наиболее вероятных конформаций отдельных остатков ДАБК в $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$ суммированы в табл. 1.

Конформация С-концевого трипептида ДАБК. Предположение об образовании водородной связи Ser⁶OH...-OOC — наиболее вероятное объяснение ряда параметров ЯМР остатков 6 и 8 [7] — нуждается в отдельной расчетной проверке. Для изучения условий образования этой водородной связи была проведена минимизация конформационной энергии трипептида Ac-Ser-Pro-Phe-OH (потенциалы из работы [14]) во всех стерически допустимых сочетаниях локальных энергетических минимумов отдельных остатков. В табл. 2 приведены углы внутреннего вращения и некоторые характеристики конформеров трипептида, содержащих искомую водородную связь. Конформеры 1—3 в табл. 2 относятся к наиболее низкоэнергетическим структурам трипептида ($E - E_{\text{min}} \simeq 0,2$ ккал/моль при оптимальных конформациях боковой цепи Phe) и различаются глав-

Характеристики конформеров трипептида Ser-Pro-Phe-OH, образующих водородную



Номер конформации	Ser			Pro	Phe		Расстояние OH...O=C, Å	S _{NH} [*] , Å ²		³ J _{NH^αH^β} ^{Phe} , Гц ^{**}
	χ ₁	χ ₂	ψ	ψ	φ	ψ		Ser	Phe	
1	63	128	151	-13	-154	166	1,7	5,7	0	7,1
2	161	-139	148	-12	-139	138	1,7	6,1	0	9,0
3	-168	-73	94	-8	-140	176	1,7	9,3	0	8,9
4	151	-92	148	68	97	-171	1,8	6,1	2,3	5,1
5	67	88	149	68	103	-170	1,8	7,8	2,3	4,2

* Доступная растворителю поверхность амидных протонов; детали расчета см. в тексте.

** Рассчитано с помощью зависимости [17].

ным образом конформацией остатка Ser. При характерной для этих структур конформации типа А остатка пролина ($\psi \approx -10 \div -20^\circ$) амидный протон фенилаланина полностью экранирован от растворителя пиirroлидиновым кольцом и остовом трипептида, что согласуется с низким значением $\Delta\delta/\Delta T$, наблюдаемым для NH(Phe⁸)ДАБК (ср. доступные поверхности амидных протонов Ser и Phe в табл. 2).

Ожидаемое значение вицинальной константы ${}^3J_{\text{NH}^\alpha\text{H}^\beta}$ Phe для конформера 1 близко к экспериментальной величине 6,8 Гц. Увеличение ${}^3J_{\text{NH}^\alpha\text{H}^\beta}$, предсказываемое в конформерах 2 и 3, связано с небольшим изменением угла φ фенилаланина и может быть следствием расчетных приближений, например фиксированной геометрии кольца пролина. С другой стороны, замена в ДАБК серина на аланин приводит к снижению вицинальной константы ${}^3J_{\text{NH}^\alpha\text{H}^\beta}$ Phe⁸ [7]. Поэтому наблюдаемое для ДАБК значение этой константы может отражать равновесие между замкнутыми водородной связью конформерами С-концевого трипептида и некоторой долей «открытых» конформеров.

Две равные по величине вицинальные константы ${}^3J_{\text{H}^\alpha\text{C}^\beta\text{H}^\gamma} = 6,8$ Гц, наблюдаемые для Ser⁶ ДАБК, не соответствуют какому-либо конкретному значению угла χ₁ [15], т. е. боковая цепь Ser⁶ достаточно лабильна. Исследование условий замыкания водородной связи (Ser)OH...-OOC показало, что прочная водородная связь образуется в структурах типа 1—3 при значениях χ₁ серина в интервале $50 \div -160^\circ$ с соответствующими изменением угла χ₂ и небольшой подгонкой остальных углов внутреннего вращения. Усреднение вицинальных констант ${}^3J_{\text{H}^\alpha\text{C}^\beta\text{H}^\gamma}$ по кривой Де Марко с соавт. [16] в предположении равномерного распределения χ₁ в указанном интервале дает величины 6,0—7,0 Гц, близкие к наблюдаемым экспериментально.

В работе [7] предложена альтернативная модель пространственной структуры С-концевого трипептида ДАБК с γ-изгибом в районе остатка Pro⁷ и двумя водородными связями: (Ser⁶)OH...-OOC и (Ser⁶)CO...-NH(Phe⁸). Подобных структур не оказалось среди низкоэнергетических конформеров трипептида Ac-Ser-Pro-Phe-OH. Структуры, близкие к предложенной в работе [7] (см. конформеры 4 и 5 в табл. 2), были обнаружены при расчете С-концевого трипептида аналога [D-Phe⁸]ДАБК (результаты будут опубликованы позднее). Подстановка в эти конформации L-фенилаланина приводит к энергетически запрещенному перекрыванию ван-дер-ваальсовых сфер β-углерода Phe и карбонильного кислорода Pro, а минимизация энергии по всем углам внутреннего вращения трипептида дает структуры с $E - E_{\text{min}} > 12$ ккал/моль и очень слабыми водородными связями. Таким образом, модель, предложенная в [7], по-

видимому, стерически несостоятельна, и низкоэнергетические конформеры 1—3 табл. 2 представляют единственный тип структуры С-концевого трипептида ДАБК, согласующийся с большинством данных ^1H -ЯМР в $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$. Наблюдаемые вицинальные константы не исключают, однако, наличия определенной доли «открытых» конформеров трипептида.

Теоретический конформационный анализ молекулы ДАБК. Расчеты конформационной энергии проводили на ЭВМ ИР-100 с использованием стандартной геометрии пептидов и потенциальных функций Момани с соавт. [14]. Для всех пептидных групп ДАБК была принята плоская *транс*-конформация, пирролидиновые кольца пролинов фиксировали в конформации «down» [14]. Большая часть расчетов была проведена при диэлектрической постоянной диметилсульфоксида $\epsilon = 47$, конечные результаты пересчитывали с $\epsilon = 10$ (см. ниже). Для обозначения конформаций остова аминокислотных остатков принят однобуквенный код [13]. Гуанидиновую группу аргинина и обе концевые группы ДАБК считали заряженными. Вицинальные константы $^3J_{\text{HNC}^\alpha\text{H}}$ рассчитывали с помощью уравнения Карплуса с параметрами В. Ф. Быстрова и соавт. [17]. Для оценки площади доступной растворителю поверхности амидных протонов (далее для краткости именуется доступной поверхностью S_{NH}) использовали модифицированный алгоритм Ли и Ричардса [18] с набором вандер-ваальсовых радиусов Бонди [19] и радиусом моделирующей растворитель пробной сферы, равным 1,4 Å. Приложимость этого подхода для качественной оценки доступности амидных протонов диметилсульфоксиду обсуждалась в работах [9, 20].

Локальные стерические ограничения, вносимые тремя остатками пролина, и ограничения ЯМР определяют узкий круг наиболее вероятных конформаций концевых дипептидов ДАБК в $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$ (табл. 1). Число возможных комбинаций конформеров остова центральных остатков 3—6 остается, однако, весьма значительным ($2 \times 6 \times 4 \times 4 = 192$ комбинации). Отбор низкоэнергетических конформаций ДАБК, удовлетворяющих данным ЯМР, проводили в три этапа.

1. Минимизация конформационной энергии фрагмента $\text{NH}_3^+\text{-Ala-Pro-Gly-Phe-Ser-Pyr}$, моделирующего N-концевую часть молекулы ДАБК, включая пирролидиновое кольцо (Pyr) остатка Pro^7 , но без боковой цепи Arg^1 . Для отбора конформаций данного фрагмента, рассматриваемых в дальнейших расчетах, использовали следующие критерии: а) конформационная энергия $E - E_{\text{min}}$ не превышает 10 ккал/моль; б) сохраняется возможность замыкания солевого мостика $\text{Arg}^1 \dots ^-\text{OOC}$ в полной молекуле ДАБК. С учетом максимальных размеров боковой цепи аргинина (~ 7 Å) и недостающего С-концевого участка (~ 4 Å) отобраны конформации модельного фрагмента, у которых расстояние между атомом C^β остатка 1 и последним С-концевым атомом фрагмента (C^7Pro^7) не превышает 15 Å; в) амидный протон серина не экранирован от растворителя. Доступные поверхности этого протона в конформациях, удовлетворяющих условиям «а» и «б», изменяются в пределах 0—9 Å². Для дальнейшего расчета отобраны конформации, в которых амидный протон серина по крайней мере частично доступен растворителю ($S_{\text{NH}} \geq 3$ Å²).

Согласно критериям «а» — «в» отобрано 24 из 192 рассмотренных конформаций модельного фрагмента.

2. Минимизация конформационной энергии $[\text{Ala}^1]\text{ДАБК}$. Начальные конформации получены совмещением 24 отобранных конформаций N-концевого гексапептида с конформерами С-концевого трипептида, в которых образуется водородная связь $(\text{Ser})\text{OH} \dots ^-\text{OOC}$ (табл. 2). При этом структуры гексапептида с конформациями типа *E* и *F* остатка Ser ($\psi \simeq 150^\circ$) совмещались с конформером 1 табл. 2, а структуры с конформациями типа *D* и *A^** Ser ($\psi \simeq 90^\circ$) — с конформером 3 табл. 2. Для сокращения объема расчетов отдельно не учитывался конформер 2 табл. 2, имеющий структуру остова, близкую к конформеру 1, и не рассматривались низкоэнергетические конформеры С-концевого трипептида, не содержащие предполагаемой водородной связи.

В результате расчета отобрано 18 низкоэнергетических конформаций остова $[Ala^1]ДАБК$ ($E - E_{min} \leq 10$ ккал/моль) с расстоянием между атомом C^β остатка 1 и углеродом С-концевой карбоксильной группы, не превышающем 12 Å. Отметим, что используемым на этапах 1 и 2 критериям отбора удовлетворяют структуры, содержащие лишь 4 из 12 рассматривавшихся первоначально конформеров дипептида Pro^3-Gly^4 , причем преобладает близкий к β -изгибу III конформер типа AA с отрицательными значениями углов ψ_3 , ϕ_4 и ψ_4 (в 12 из отобранных конформаций $[Ala^1]ДАБК$) или конформер типа CA* с положительными значениями тех же углов (в 4 конформациях $[Ala^1]ДАБК$).

Результаты этого этапа помимо упрощения перехода от расчета фрагментов к полной молекуле ДАБК имеют самостоятельное значение, так как $[Ala^1]ДАБК$ — достаточно активный аналог ДАБК в тканях с рецепторами V_1 [2].

3. Расчет полной молекулы ДАБК. Перед минимизацией конформационной энергии последовательным вращением углов $\chi_1 - \chi_4$ с расчетом энергии взаимодействия между боковой цепью Arg^1 и остальной частью молекулы (см. [21]) найдены оптимальные начальные конформации боковой цепи аргинина. Помимо 18 структур, отобранных на предыдущем этапе расчета, минимизация энергии проведена также для 10 конформаций ДАБК, полученных ранее с использованием другой системы потенциальных функций и без учета экспериментальных ограничений [4]. Включение этих структур позволяет проверить эффективность отбора конформаций на предварительных этапах расчета, а также сопоставить энергии конформаций, удовлетворяющих и не удовлетворяющих данным ЯМР. Все 18 конформаций ДАБК, отобранных с использованием экспериментальных данных, обладают энергией $E - E_{min} < 10$ ккал/моль. Этому же энергетическому критерию удовлетворяют 6 их 10 найденных ранее [4] конформаций ДАБК.

Описанные выше расчеты проводили при диэлектрической постоянной диметилсульфоксида $\epsilon = 47$. Однако использование макроскопической диэлектрической постоянной растворителя для оценки электростатических взаимодействий близко расположенных заряженных групп, по-видимому, не вполне оправдано. Так, в наиболее низкоэнергетических при $\epsilon = 47$ конформациях ДАБК расстояние между центром гуанидиновой группы аргинина (атом C^ϵ) и углеродом С-концевого карбоксила колеблется от 3,5 Å (стабильный солевой мостик) до 9 Å, причем увеличение этого расстояния при изменении конформации боковой цепи Arg^1 не сопровождается заметным повышением энергии. Иными словами, расчет при $\epsilon = 47$ не дает предпочтения конформациям ДАБК со сближенными гуанидиновой и карбоксильной группами. Пробный расчет показал, что определенная стабилизация конформаций с солевыми мостиками (на 2—3 ккал/моль сравнительно с «открытыми» конформациями) достигается при $\epsilon = 10$. Хотя выбор такого значения ϵ не является строго оправданным, для 24 конформаций ДАБК была проведена новая минимизация энергии при $\epsilon = 10$, причем в структурах с удаленными гуанидиновой и карбоксильной группами повторялась процедура поиска начальной конформации боковой цепи аргинина. По результатам этого расчета отобрано 20 конформаций ДАБК, удовлетворяющих условию $E - E_{min} \leq 10$ ккал/моль. Наиболее характерные из этих конформаций описаны в табл. 3.

Сопоставление низкоэнергетических конформаций ДАБК с данными 1H -ЯМР. Для 20 низкоэнергетических конформаций ДАБК рассчитаны ожидаемые значения вицинальных констант $^3J_{HNC\alpha H}$ и оценен ряд структурных параметров (расстояния между центрами гуанидиновой и карбоксильной групп, внутримолекулярные водородные связи и доступная поверхность амидных протонов), которые в табл. 3 сопоставляются с данными спектроскопии 1H -ЯМР [7]. Поскольку в расчетном наборе имеются группы структур, близких как по конформации остова, так и по предсказываемым параметрам ЯМР, в табл. 3 приведены данные лишь для наиболее характерных конформаций ДАБК.

Отметим прежде всего, что наиболее низкоэнергетическая конформа-

Характеристики расчетных низкоэнергетических конформаций ДАБК в сопоставлении с данными ¹H-ЯМР [7]

№	Конформация остова *	E = F _{min} [*] ккал/моль	Контакт Агг+ ... -ООС		Наличие H-связи (Ser) ^o OH ... -ООС	Доступные поверхности **				³ J _{HNC^oCD} Гц ^{4*}				Тип структу- ры	
			Расстоя- ние ³ , Å	Наличие H-связи		Gly ⁴	Phe ⁵	Ser ⁶	Phe ⁸	Gly ⁴	Phe ⁸	Ser ⁶	Phe ⁸		
1	FFAAAECE	0,0	4,9	-	-	0,4	0	0	0	0	4,4; 8,3	8,9	4,1	8,5	-
2	FFAAADAЕ	2,2	6,7	-	-	0,6	0	0	0	0	5,0; 8,1	8,2	8,1	7,8	-
3	FFFC*EEAE	1,2	7,0	-	-	12,0	1,6	1,6	0	0	7,5; 6,3	8,9	9,3	8,5	-
4	FFAADA*AE	1,4	3,9	+	+	0,3	0	5,3	0	0	5,5; 7,9	9,1	8,0	9,0	I
5	FFAA ^o CA*BE	1,8	4,6	+	+	0,9	0,9	6,6	0	0	4,4; 8,3	8,7	7,9	8,4	I
6	FFAAEA*BE	1,9	4,5	+	+	0,7	0	7,2	0,1	0	3,8; 8,3	9,6	7,9	9,3	I
7	FFAAEDAЕ	4,2	4,2	+	+	0,3	0	7,8	0	0	3,2; 8,4	7,3	8,2	7,8	II
8	FFAHFDAE	4,9	3,5	+	+	0,2	3,8	3,6	0	0	5,5; 7,9	8,9	9,1	7,8	II
9	FFCA*DPBE	4,8	3,9	+	+	3,5	0,8	2,5	0	0	8,3; 4,0	7,6	7,3	8,5	III
10	FFCAGDBE	7,2	5,4	-	-	0	2,6	4,1	0	0	8,5; 5,9	8,9	7,4	8,5	IV
	Данные ¹ H-ЯМР **			+	+	1,7	4,7	7,6	0	0	4,4; 6,8	8,6	7,4	6,8	

* Однобуквенные обозначения конформаций остова остатков см. в [13].

** Расстояние между центрами заряженных групп: атомы C_α гуанидиновой группы и C' карбоксильной группы.

** Доступные относительно поверхности амидных протонов (детали расчета см. в тексте) сопоставляются с температурными коэффициентами Δδ/ΔT. Подчеркнуты величины для амидных протонов, участвующих во внутримолекулярной водородной связи.

** Рассчитано с помощью зависимости [17].

Значения углов внутреннего вращения в некоторых низкоэнергетических конформациях ДАБК

Остаток	Угол	Конформация							
		4	5	6	7	8	9	10	
Arg ¹	φ	-59	-55	-47	-75	-77	-59	-57	
	ψ	158	156	153	155	149	158	156	
	χ_1	-87	-67	-60	65	59	-83	-78	
	χ_2	179	180	179	-101	-174	-154	179	
	χ_3	-88	-179	180	-178	72	180	-68	
Pro ²	χ_4	119	150	149	151	-173	-148	148	
	ψ	163	164	161	165	161	169	164	
Pro ³	ψ	-20	-34	-27	-18	-19	75	71	
	φ	-74	-66	-64	-60	-74	65	-93	
Gly ⁴	ψ	-18	-63	-41	-49	-93	63	-65	
	φ	-138	-98	-132	-153	-100	-151	-140	
	ψ	62	118	118	159	155	31	-53	
Phe ⁵	χ_1	-60	180	180	54	-159	-84	-61	
	χ_2	90	60	60	90	85	117	-84	
	φ	59	53	56	-146	-138	-153	-152	
Ser ⁶	ψ	104	89	92	95	95	93	91	
	χ_1	-106	-164	-167	-164	-162	-164	-164	
	χ_2	-74	-64	-67	-67	-68	-69	-67	
Pro ⁷	ψ	-12	-5	-7	-11	-10	-8	-7	
	φ	-139	-145	-136	-149	-149	-144	-144	
	ψ	174	175	170	179	173	173	175	
Phe ⁸	χ_1	60	60	-60	62	63	61	61	
	χ_2	90	90	-61	90	90	88	87	

ция 1 и близкая к ней по структуре N-концевого пентапептида конформация 2 не согласуются со многими данными спектроскопии ЯМР. Обе конформации имеют водородную связь с участием NH Ser⁶, но не предсказывают водородных связей C-концевого карбоксила с протонами гуанидиновой группы Arg¹ и гидроксильной группы Ser⁶. Конформация 3, не образующая солевого мостика и обладающая полностью доступным растворителю амидным протоном Gly⁴, также не согласуется с данными ЯМР. Конформации 1—3 получены в результате пересчета в системе потенциалов [14] конформаций ДАБК, найденных ранее [4] без учета экспериментальных ограничений. Очевидно, что эти структуры, хотя и обладают низкой конформационной энергией, не принадлежат к числу предпочтительных конформеров ДАБК в (CD₃)₂SO.

Два типа пространственной структуры ДАБК представлены в табл. 3 группами близких по форме пептидного остова конформаций 4—6 (тип I) и 7, 8 (тип II). Оба типа структур имеют сходные конформации N-концевого пентапептида и C-концевого дипептида, различным образом ориентированные друг относительно друга за счет разных значений угла φ остатка Ser⁶. Тетрапептид Pro²-Phe⁵ имеет конформации, близкие к β -изгибу III [22]. Оба типа структур хорошо согласуются с данными ЯМР, обладая сближенными гуанидиновой и карбоксильной группами, водородной связью Ser⁶ OH...OOC, доступным растворителю амидным протоном Ser⁶ и экранированными (без образования внутримолекулярных водородных связей) амидными протонами Gly⁴ и Phe⁸. Вероятные причины завышенного в некоторых расчетных конформациях значения вицинальной константы $^3J_{\text{HNC}^{\alpha}\text{H}}$ остатка Phe⁸ обсуждались. Значения других вицинальных констант $^3J_{\text{HNC}^{\alpha}\text{H}}$, предсказываемые в конформациях 4—8, отличаются от экспериментальных величин не более чем на 2,0 Гц, что с учетом возможных флуктуаций углов φ и погрешности зависимости $^3J_{\text{HNC}^{\alpha}\text{H}}$ от φ [17] можно считать неплохим совпадением. Два других типа пространственной структуры ДАБК, представленных конформациями 9 (тип III) и 10 (тип IV) табл. 3, также согласуются с экспериментальными данными, но отличаются от описанных выше структур наличием внутримолекулярной водородной связи (Gly⁴) NH...OC(Pro³) (γ -изгиб с центральным остатком Pro³)

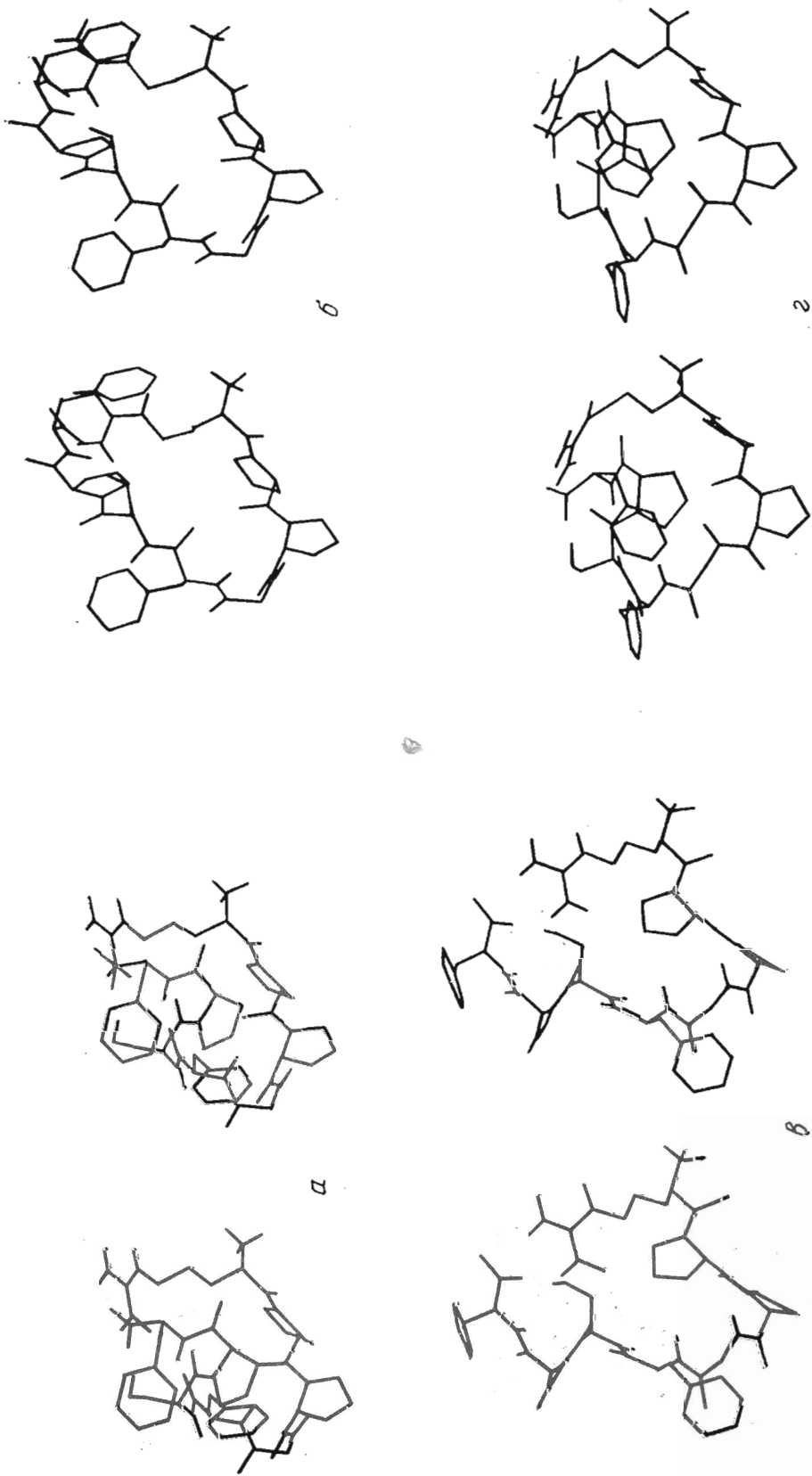
и иным стереоспецифическим отнесением высокой и низкой вицинальных констант ${}^3J_{\text{HNC}\alpha\text{H}}$ остатка Gly⁴. γ -Изгиб с центральным остатком Pro³ является одним из элементов предложенной в [7] модели пространственной структуры ДАБК. Однако, как показано выше, второй γ -изгиб этой модели (с центральным остатком Pro⁷) стерически несовместим с образованием внутримолекулярной водородной связи (Ser⁶)OH . . . -OOC.

В большинстве конформаций табл. 3 амидный протон остатка Phe⁵ экранирован от растворителя, что не вполне согласуется с температурной зависимостью химического сдвига этого протона в (CD₃)₂SO [7]. По величине температурного коэффициента $\Delta\delta/\Delta T$ амидный протон Phe⁵ не может быть однозначно отнесен ни к полностью доступным растворителю (ср. с NH(Ser⁶)), ни к экранированным от растворителя (ср. с NH(Gly⁴) и (Phe⁸)). Промежуточное значение $\Delta\delta/\Delta T$ вероятно в случае равновесия конформеров с экранированным и доступным растворителю амидным протоном. Подобная ситуация хорошо иллюстрируется сопоставлением конформаций 7 и 8 (см. табл. 4). Обе конформации отличаются поворотом пептидной группы Gly⁴-Phe⁵ приблизительно на 50° без изменения общей формы пептидного остова молекулы. Такое локальное изменение пространственной структуры делает амидный протон Phe⁵ в конформации 8 доступным растворителю.

Обсуждение результатов

Низкоэнергетические конформации 4—10 (а также ряд близких к ним конформаций, не включенных в табл. 3) получены с учетом экспериментальных ограничений, относящихся к элементам предпочтительной пространственной структуры ДАБК в растворе (CD₃)₂SO. Наличие у цвиттер-ионной формы молекулы доминирующих конформеров проявляется в близких к экстремальным значениям некоторых параметров ЯМР (температурные коэффициенты $\Delta\delta/\Delta T$ амидных протонов Gly⁴, Ser⁶ и Phe⁸, вицинальная константа ${}^3J_{\text{HNC}\alpha\text{H}}$ Phe⁵), а также в изменении характеристик спектров ¹H-ЯМР при нейтрализации карбоксильной группы или модификации отдельных боковых цепей пептида. Если в растворе присутствуют минорные конформеры, их влияние, в силу небольших статистических весов или локального сродства с доминирующими конформерами, может проявляться лишь в части наблюдаемых параметров спектров ЯМР. К таким усредненным ЯМР-параметрам могут быть отнесены не вполне согласующиеся с расчетными характеристиками предлагаемых конформаций ДАБК вицинальные константы ${}^3J_{\text{HNC}\alpha\text{H}}$ Ser⁶ и ${}^3J_{\text{HNC}\alpha\text{H}}$ Phe⁸, а также температурный коэффициент амидного протона Phe⁵. Таким образом, описанные выше четыре типа конформаций являются стерически состоятельными моделями пространственной структуры ДАБК в (CD₃)₂SO, но не исключают существования других, минорных конформеров молекулы. Стереорепрезентации конформаций, представляющих каждый из четырех типов структуры ДАБК, даны на рисунке, а соответствующие конформациям 4—10 углы внутреннего вращения приведены в табл. 4.

Имеющихся экспериментальных данных недостаточно для дискриминации какого-либо из предложенных типов пространственной структуры ДАБК. Более того, результаты ЯМР работы [7] согласуются также с с предположением о равновесии в растворе структур типа I и II или III и IV. Небольшое преимущество конформаций типа I в энергии внутримолекулярных взаимодействий также не является основанием для выбора этой модели пространственной структуры ДАБК в растворе, поскольку столь же низкоэнергетические конформации 1—3 табл. 3 однозначно дискриминируются при сопоставлении с экспериментальными данными. Не учитываемые в расчетах конформационной энергии энтропийные факторы и взаимодействия с растворителем способны дестабилизировать конформации, весьма выгодные с точки зрения внутримолекулярных взаимодействий. Пожалуй, лишь структуру типа IV можно считать, исходя из энергетических соображений, менее вероятной. Кроме того, в этой конформации



Стереизображение конформаций 4 (a), 8 (б), 9 (в) и 10 (г) из табл. 3, 4, представляющих четыре типа вероятной пространственной структуры ДАБК в $(CD_3)_2SO$

(рис. 1г) гуанидиновая группа аргинина, хотя и сближена с С-концевой частью молекулы, не образует водородных связей с карбоксильной группой.

В качестве критерия выбора одной или нескольких из предлагаемых моделей предпочтительной пространственной структуры ДАБК в $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$ можно предложить измерение локальных ядерных эффектов Оверхаузера (см. [23, 24]). Так, структуры типа III и IV предсказывают интенсивный ЯЭО между протонами $\text{C}^\alpha\text{H Pro}^3$ и NH Gly^4 , а структуры типа I и II — отсутствие или слабый эффект. Структуры типа I могут быть идентифицированы сравнением интенсивностей ЯЭО между амидными и α -протонами в остатках 5, 6 и 8, так как только эти структуры предсказывают малое межпротонное расстояние $d_{\text{N}\alpha} \simeq 2,2 \text{ \AA}$ в остатке Ser⁶. Структура типа IV должна проявляться в растворе интенсивным ЯЭО между амидными протонами Phe⁵ и Ser⁶. Кроме того, только в этой структуре более интенсивный из двух ЯЭО между амидным и α -протонами глицина соответствует меньшей по величине вицинальной константе $^3J_{\text{HNC}^\alpha\text{H}}$.

Отметим в заключение, что лишь одна из расчетных конформаций ДАБК, полученных в работе [4], удовлетворяет данным ЯМР (конформация 6 в табл. 3). Использование экспериментальных ограничений позволило, таким образом, более полно и целенаправленно исследовать пространственную структуру пептида в растворе. Соотношение между пространственной структурой ДАБК в растворе и конформациями, которые пептид может принимать при взаимодействии с рецепторами B_1 , предполагается обсудить в следующей публикации этой серии.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Barabé J., Drouin J.-N., Regoli D., Park W. K. Can. J. Physiol. and Pharmacol. 1977. V. 55. № 6. P. 1270—1285.
2. Regoli D., Barabé J. // Pharmacol. Rev. 1980. V. 32. № 1. P. 1—46.
3. Regoli D., Barabé J., Park W. K. / Can. J. Physiol. and Pharmacol. 1977. V. 55. № 4. P. 855—867.
4. Никифорович Г. В., Подиный Л. У. // Биоорган. химия. 1982. Т. 8. № 4. С. 453—461.
5. Marceau F., Gendreau M., Barabé J., St.-Pierre S., Regoli D. // Can. J. Physiol. and Pharmacol. 1981. V. 59. № 2. P. 131—138.
6. Regoli D., Drapeau G., Rovero P., Dion S., Rhaleb N.-E., Barabé J., D'Orleans-Juste P., Ward P. // Eur. J. Pharmacol. 1986. V. 127. № 3. P. 219—224.
7. Dive V., Lintner K., Femandjian S., St.-Pierre S., Regoli D. // Eur. J. Biochem. 1982. V. 123. № 1. P. 179—190.
8. Шендерович М. Д., Саулитис Ю. Б., Никифорович Г. В. // Межмолекулярные взаимодействия и конформации молекул. Пуцино: Научный центр биологических исследований АН СССР, 1987. С. 100—114.
9. Shenderovich M. D., Nikiiforovich G. V., Saulitis J. B., Chipens G. I. // Biophys. Chem. 1988. V. 31. № 1—2. P. 163—173.
10. Bundi A., Grathwohl C., Hochmann J., Keller R. M., Wagner G., Wüthrich K. // J. Magn. Reson. 1975. V. 18. № 1. P. 191—198.
11. Kessler H. // Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 1982. V. 21. № 7. P. 512—623.
12. Sekacs I., Shenderovich M., Nikiiforovich G., Liepins E., Polevaya L., Chipens G. // Coll. Czech. Chem. Commun. 1988. V. 53. № 11B. P. 2810—2824.
13. Zimmermann S. S., Scheraga H. A. // Biopolymers. 1977. V. 16. № 4. P. 811—843.
14. Momany F. A., McGuire R. P., Burgess A. W., Scheraga H. A. // J. Phys. Chem. 1975. V. 79. № 22. P. 2361—2381.
15. Nagayama K., Wüthrich K. // Eur. J. Biochem. 1981. V. 115. № 3. P. 653—657.
16. DeMarco A., Llinás M., Wüthrich K. // Biopolymers. 1978. V. 17. № 3. P. 617—636.
17. Bystrov V. F., Ivanov V. T., Portnova S. L., Balashova T. A., Ovchinnikov Yu. A. // Tetrahedron. 1973. V. 29. № 6. P. 873—877.
18. Lee B., Richards F. M. // J. Mol. Biol. 1971. V. 55. № 3. P. 379—400.
19. Bondi A. // J. Phys. Chem. 1964. V. 68. № 3. P. 441—451.
20. Snyder J. R. // J. Amer. Chem. Soc. 1984. V. 106. № 8. P. 2393—2400.
21. Никифорович Г. В., Шендерович М. Д., Балодис Ю. Ю. // Биоорган. химия. 1981. Т. 7. № 2. С. 179—188.
22. Lewis P. N., Momany F. A., Scheraga H. A. // Biochim. et biophys. acta. 1973. V. 303. № 2. P. 211—229.
23. Wüthrich K., Billetter M., Braun W. // J. Mol. Biol. 1984. V. 180. № 3. P. 715—740.
24. Shenderovich M. D., Nikiiforovich G. V., Chipens G. I. // J. Magn. Reson. 1984. V. 59. № 1. P. 1—12.

Поступила в редакцию
11.1.1989.

CONFORMATION-FUNCTION RELATIONSHIP FOR [des-Arg⁹]BRADYKININ.
I. MOLECULAR CONFORMATIONS IN SOLUTION

SHENDEROVICH M. D.

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

The spatial structure of [des-Arg⁹]bradykinin, a selective agonist of the B₁ type kinin receptors, was studied by means of theoretical conformational analysis. In order to restrict the number of conformations under consideration, we used available data on ¹H NMR in (CD₃)₂SO solution indicating the C-terminal carboxyl group to interact with the guanidine group of Arg¹ and the hydroxyl group of Ser⁶. The calculated set of [des-Arg⁹]bradykinin low-energy conformations was compared with the ¹H NMR data. Four types of conformations were selected, which are consistent with the experimental data and serve as sterically reliable models for the preferable three-dimensional structure of [des-Arg⁹]bradykinin in solution.