



УДК 615.33 : 543.422.23

© 1991 г.

В. В. Оханов, П. В. Дубовский, А. И. Мирошников

**СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ  
ПОЛИМИКСИНОВ. <sup>1</sup>H-ЯМР-АНАЛИЗ КОНФОРМАЦИИ  
ПОЛИМИКСИНОВ В И М***Всесоюзный научно-исследовательский институт лекарственных растений, Москва*

С помощью одно- и двумерной <sup>1</sup>H-ЯМР-спектроскопии проведено сравнение конформационных особенностей полимиксинов В и М. Обнаружено, что циклическая часть полимиксина М обладает большей конформационной лабильностью, что, по-видимому, обуславливает гидролиз антибиотика, в отличие от полимиксина В, под действием субтилизина по связи Dab<sup>8</sup>-Dab<sup>9</sup>. Аналогичная корреляция показана для дез-(1-3)-аналога полимиксина В.

Изучение молекулярных основ биологического действия мембрано-активных антибиотиков полипептидной природы группы полимиксина предполагает сопоставление их химических и пространственных структур. Такое сопоставление может позволить объяснить некоторые особенности действия гомологичных соединений на бактериальную мембрану.

Цель настоящего исследования — сравнительный анализ пространственной структуры полимиксинов В и М, выпускаемых отечественной промышленностью и используемых в медицинской практике в качестве лекарственных препаратов и при получении полусинтетических аналогов.

Полимиксины В и М — антибиотики со сходным спектром антимикробного действия, обладающие преимущественной активностью в отношении грамотрицательных бактерий. Различия в химической структуре этих соединений касаются аминокислотных остатков в положениях 6 и 7 (полимиксин В содержит D-Phe-Leu — см. рис. 1). Промышленные препараты полимиксинов В и М представляют собой смесь индивидуальных компонентов, различающихся структурой N-концевого ацильного радикала R. В обоих случаях это преимущественно остатки 6-метилоктановой и 6-метилгептановой кислот [1]. Характерной структурной особенностью всех полимиксинов является наличие в молекуле линейной и циклической частей, причем цикл создается добавочной пептидной связью между Thr<sup>10</sup> и γ-аминогруппой остатка Dab<sup>4</sup>.

Информация о пространственной структуре полимиксина В (РВ) в растворе получена рядом авторов с помощью ЯМР-спектроскопии [2-5]. В частности, было обнаружено, что в циклической части антибиотика образуются два β-изгиба.

Сравнение РВ с его укороченным аналогом циклононапептидом, который был выделен после воздействия на РВ папаином, показало отсутствие влияния отщепляемой ферментом ациламинокислоты на конформацию циклической части молекулы [2].

Представляло особый интерес сопоставление полученных для РВ данных с пространственной структурой полимиксина М (РМ), вариантный участок последовательности которого включается в один из β-изгибов. В предыдущей статье нами было проведено исследование РМ с помощью

Сокращения: Dab — 2,4-диаминоасляная кислота, РВ и РМ — полимиксины В и М, COSY — двумерная корреляционная спектроскопия, RELAY — спектр двумерной трансляционной когерентной передачи намагниченности, ЦГП — циклогептапептид — дез-(1-3)-полимиксин В.

одно- и двумерной  $^1\text{H}$ -ЯМР-спектроскопии [6]. Настоящая работа — продолжение сравнительного изучения конформационных особенностей РВ и РМ.

При проведении структурных исследований методом ЯМР-спектроскопии первым и одним из наиболее важных этапов является отнесение сигналов. В настоящее время в пептидах и белках эта задача успешно решается с помощью двумерной спектроскопии. В частности, при анализе двумерных спектров корреляционной спектроскопии (COSY) можно выделить протоны, связанные спин-спиновым взаимодействием [7]. Однако удобнее использовать двумерные спектры трансляционной когерентной передачи намагниченности (RELAY), позволяющие в отличие от COSY сразу провести дифференциацию сигналов протонов NH по типу аминокислотных остатков [8]. Этот вид двумерных экспериментов успешно использовался ранее для отнесения сигналов при изучении РВ, РМ и их аналогов [4, 6, 9]. На рис. 2 в качестве примера приведено отнесение сигналов протонов NH гуанидильрованного аналога РМ [10].

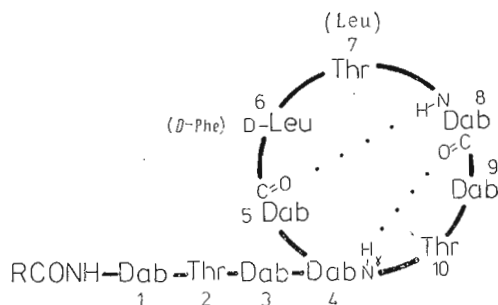


Рис. 1. Полимиксин М (в скобках приведены замены в полимиксине В)

В двумерном спектре RELAY для протонов NH за счет многоступенчатой передачи намагниченности кроме кросс-пиков, соответствующих спин-спиновому взаимодействию с протонами  $\text{C}^{\alpha}\text{H}$  ( $\omega_1$  4,1–4,7 м. д.), появляются и кросс-пики сигналов протонов боковой цепи аминокислотных остатков. Так, наличие кросс-пика при 1,64 м. д. по  $\omega_1$  (сигналы протонов  $\text{C}^{\beta}\text{H}_2$  и  $\text{C}^1\text{H}$  лейцинового остатка) относит сигнал NH при 8,55 м. д. к Leu, а кросс-пики при 1,19 м. д. по  $\omega_1$ , соответствующие сигналам  $\text{CH}_3$ , относят сигналы NH при 8,20 и 8,68 м. д. к треониновым остаткам. Третий треониновый сигнал NH при 7,88 м. д. может быть выделен на основании наличия в области  $\text{C}^{\alpha}\text{H}$ -сигналов второго кросс-пика, соответствующего сигналу  $\text{C}^{\beta}\text{H}$ . Сигнал  $\gamma\text{-NH}$  остатка Dab<sup>4</sup> идентифицируется однозначно на основании триплетной структуры, обусловленной  $\text{C}^{\beta}\text{H}_2$ -протонами. Все остальные сигналы NH относятся к остаткам шести Dab и кроме кросс-пиков в области  $\text{C}^{\alpha}\text{H}$ -сигналов имеют кросс-пики от  $\text{C}^{\beta}\text{H}_2$ -протонов в диапазоне 1,8–2,3 м. д. по  $\omega_1$ .

Аналогичным образом было получено отнесение сигналов из спектров RELAY для хлоргидрата и сульфата РМ (рис. 3а и б соответственно). Отнесение к конкретным аминокислотным остаткам одинаковых спиновых систем выполнено при сравнении спектров РВ, РМ и их аналогов [2, 4–6].

Ранее [5] на основании низких значений температурных коэффициентов химических сдвигов двух сигналов NH ( $\gamma\text{-NH}$  Dab<sup>4</sup> и одного из Dab), а также малых значений констант спин-спинового взаимодействия ( $K_{\text{CCB}}$ )  $^3J_{\text{HN}-\text{C}^{\alpha}\text{H}}$  (Phe<sup>6</sup> и одного из Dab), наблюдавшихся для NH РВ в спектре  $^1\text{H}$ -ЯМР, была предложена конформация циклической части молекулы, стабилизированная двумя водородными связями между  $\gamma\text{-NH}$  Dab<sup>4</sup> и  $\text{CO}$  Dab<sup>8</sup>, а также между  $\text{NH}$  Dab<sup>8</sup> и  $\text{CO}$  Dab<sup>5</sup>, которые формируют  $\beta$ -изгибы (рис. 1). Эти четыре характерных сигнала NH наблюдались в спектрах РВ вне зависимости от типа аниона.

В спектрах хлоргидрата РМ (рис. 3а) сигналов NH с низкими значениями  $K_{\text{CCB}}$  не наблюдается, хотя и есть сигналы с низкими значениями температурных коэффициентов химических сдвигов (анализ  $K_{\text{CCB}}$  прово-

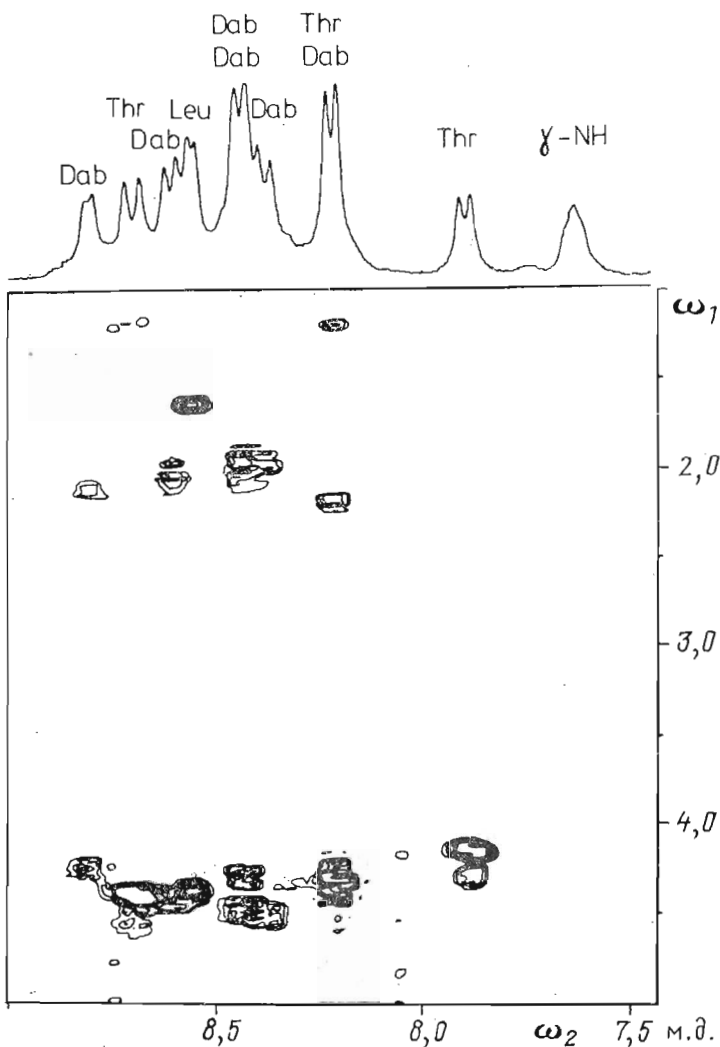


Рис. 2. Область кросс-пиков протонов NH и алифатических протонов в двумерном  $^1\text{H}$ -ЯМР-спектре RELAY гуанидильрованного полимиксин-М-сульфата, 0,05 М в  $\text{H}_2\text{O}$ , pH 2,1; 27° С [10]

дился при различных значениях температуры). На основании этого был сделан вывод [6] о сохранении в РМ системы водородных связей, аналогичных связям РВ, несмотря на различия в конформации  $\beta$ -изгибов (отклонение на 10–20° по крайней мере в торсионных углах  $\phi$  остатков  $D\text{-Leu}^6$  и  $L\text{-Dab}^9$ ) [11]. Однако изменение аниона на сульфат приводит к появлению сигналов NH с низкими значениями КССВ (рис. 3б). Параметры, приведенные в таблице для сульфата РМ, показывают хорошую корреляцию с полученными ранее для РВ с различными анионами [5], т. е. в отличие от РВ в РМ наблюдается изменение углов  $\phi$   $\beta$ -изгибов в зависимости от типа аниона.

В свете увеличенной конформационной лабильности циклической части РМ представляется интересным обнаруженный ранее факт гидролиза циклической части РМ субтилизинном между остатками  $\text{Dab}^3\text{--Dab}^9$  [9]. Как было показано нами, аналогичная дециклизация РВ происходит только на втором этапе, после расщепления РВ по связи  $\text{Dab}^3\text{--Dab}^4$ . Таким образом, гидролиз циклической части наблюдается для циклогептапептида (ЦГП), но не для нативного РВ. Было предположено, что конформационная лабильность циклической части ЦГП должна отличаться от наблюдающейся для РВ и быть аналогичной конформационной подвижности РМ. На рис. 3в, г представлены области сигналов NH хлоргидрата и сульфата

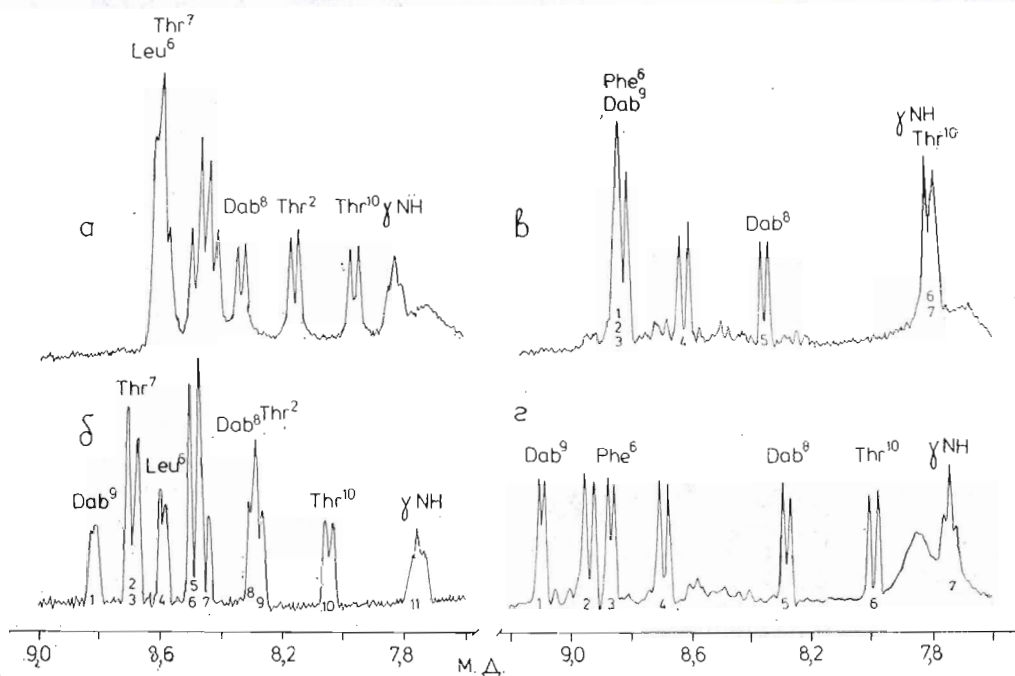


Рис. 3. Область амидных протонов: а – РМ-хлоридрат (рН 2,1; 27° С); б – РМ-сульфат (рН 2,1; 27° С); в – ЦГП-хлоридрат (рН 4,8; 27° С); г – ЦГП-сульфат (рН 2,5; 25° С)

ЦГП соответственно. Анализ полученных параметров (см. таблицу) показывает аналогию поведения сигналов протонов NH РМ и ЦГП. В обоих случаях переход от хлоридрата к сульфату приводит к появлению в спектре двух сигналов NH с низкими значениями  $^3J_{\text{HN}-\text{C}\alpha\text{H}}$ .

Параметры  $^1\text{H}$ -ЯМР-сигналов амидных протонов в РМ и ЦГП

Сигнал	РМ-сульфат		ЦГП-хлоридрат		ЦГП-сульфат	
	$^3J_{\text{HN}-\text{C}\alpha\text{H}}$ , Гц	$-\Delta\delta/\Delta T \cdot 10^3$ , м.д./град	$^3J_{\text{HN}-\text{C}\alpha\text{H}}$ , Гц	$-\Delta\delta/\Delta T \cdot 10^3$ , м.д./град	$^3J_{\text{HN}-\text{C}\alpha\text{H}}$ , Гц	$-\Delta\delta/\Delta T \cdot 10^3$ , м.д./град
1	5,3	6,0	6,0	6,3	4,8	6,8
2	7,5	6,7	7,8	4,4	7,7	4,1
3	9,1	10,0	7,2	6,7	5,1	6,5
4	5,1	6,8	7,8	7,4	8,1	7,3
5	7,4	5,0	6,0	3,2	6,2	3,1
6	7,1	7,4	7,8	3,1	8,0	3,8
7	7,3	7,4	6,0	3,0	5,1	2,2
8	6,2	2,8	(триплет)		(триплет)	
9	6,7	6,4				
10	6,7	5,7				
11	5,5	4,2				

Таким образом, сравнение результатов, полученных для РМ и ЦГП, показывает, что оба пептида сохраняют систему водородных связей, характерную для РВ, однако различаются большей лабильностью циклической части. Это, по-видимому, и является причиной, приводящей в обоих пептидах к гидролизу субтилизином связи  $\text{Dab}^8$ — $\text{Dab}^9$ .

### Экспериментальная часть

Одно- и двумерные  $^1\text{H}$ -ЯМР-спектры получены на спектрометре WM-250 (Bruker, ФРГ) с ЭВМ Aspect-2000 аналогично [6]. Полимиксин М и циклогептапептид были получены во ВНИИА согласно [6, 9] и любезно предоставлены А. А. Зинченко.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Storm D. R., Rosenthal K. S., Swanson P. E. // Ann. Rev. Biochem. 1977. V. 46. P. 723-763.
2. Оханов В. В., Байрамашвили Д. И., Траханова М. Н., Мирошников А. И. // Антибиотики. 1987. Т. 32. № 1. С. 20-23.
3. Charman T. M., Golden M. R. // Biochem. and Biophys. Res. Commun. 1972. V. 46. № 6. P. 2040-2047.
4. Macura S., Kumar N. G., Brown L. R. // J. Magn. Res. 1984. V. 60. № 1. P. 99-105.
5. Perkins S. J., Radda G. K., Richards R. E. // Eur. J. Biochem. 1978. V. 82. P. 551-561.
6. Оханов В. В., Дубовский П. В., Траханова М. Н., Барамашвили Д. И., Зинченко А. А., Мирошников А. И. // Антибиотики. 1987. Т. 32. № 10. С. 738-742.
7. Wider G., Macura S., Kumar A., Ernst R. R., Wuthrich K. // J. Magn. Res. 1984. V. 56. № 2. P. 207-234.
8. Wagner G. // J. Magn. Res. 1983. V. 55. № 1. P. 151-156.
9. Траханова М. Н., Зинченко А. А., Оханов В. В., Дубовский П. В., Байрамашвили Д. И., Мирошников А. И., Самойлова Л. Н., Фомина И. П. // Антибиотики. 1989. Т. 34. № 1. С. 20-24.
10. Zinchenko A. A., Trakhanova M. N., Bayramashvili D. I., Miroshnikov A. I., Samoylova L. N., Fomina I. P. // First Soviet-American Symposium on Antibiotics and Chemotherapy. Moscow, 1988. P. 28.
11. Bystrov V. F. // Progr. Nucl. Magn. Reson. 1976. V. 10. P. 44-81.

Поступила в редакцию  
18.II.1991

После доработки  
1.VI.1991

V. V. OKHANOV, P. V. DUBOVSKY, A. I. MIROSHNIKOV

### STRUCTURAL AND FUNCTIONAL INVESTIGATION OF POLYMYXINS. <sup>1</sup>H NMR ANALYSIS OF POLYMYXIN B AND M CONFORMATIONS

*All-Union Research Institute of Medicinal Plants, Moscow*

Spatial structures of two polymyxin antibiotics are compared by means of one- and two-dimensional <sup>1</sup>H NMR spectroscopy. Cyclic parts of polymyxins B and M contain a system of hydrogen bonds including two β-turns, however, the analysis of coupling constants <sup>3</sup>J<sub>HN-α<sub>z</sub>H</sub> demonstrated that torsional angles φ of peptide bonds of the residues forming β-turns in polymyxin M depend on the type of the anion. An increase in lability of the polymyxin M cyclic part in comparison with polymyxin B correlated with the selective cleavage of the peptide bond Dab<sup>8</sup>-Dab<sup>9</sup> of this antibiotic with subtilysine. A similar correlation was found for a short analogue of polymyxin B, a cycloheptapeptide.