



УДК 547.964.4:543.422.23

ИССЛЕДОВАНИЕ ПРОСТРАНСТВЕННОЙ СТРУКТУРЫ
МЕТИЛАМИДА *L*-Val-*L*-Tyr-*L*-Val И ЕГО ДИАСТЕРЕОМЕРОВ
МЕТОДОМ СПЕКТРОСКОПИИ ЯМР

Секацис И. П., Лиешиньш Э. Э., Анцанс Ю. Е.,
Берга Д. А., Чиненс Г. И.

Институт органического синтеза Академии наук ЛатвССР, Рига

Проведен анализ спектров ^1H - и ^{13}C -ЯМР диастереомеров Val-Tyr-Val и некоторых модельных соединений. Изучение температурных коэффициентов резонанса NH-протонов, констант спин-спинового взаимодействия и химических сдвигов групп C=O при смене растворителей показало, что значительный вклад в усредненную конформацию метиламида *L*-Val-*L*-Tyr-*L*-Val в водном растворе вносит структура с β -изгибом типа I. Распределение ротамеров боковых цепей в трипептидах зависит от растворителя. Значения спин-решеточной релаксации ядер ^{13}C свидетельствуют об ограничении подвижности фенольного кольца тирозина в *L*-Val-*L*-Tyr-*L*-Val-NHCH₃ по сравнению с *L*-Val-*D*-Tyr-*L*-Val-NHCH₃.

Амвнокислотная последовательность Val-Tyr-Val-His средней части молекулы тканевого гормона ангиотензина имеет существенное значение для проявления его специфической биологической активности [1]. Поэтому исследование пространственной структуры этого фрагмента и его аналогов может дать определенные сведения о закономерностях, определяющих формирование пространственной структуры целой молекулы гормона, а также о структурных особенностях ангиотензина, обеспечивающих его распознавание клеточными рецепторами и комплексообразование с ними. На основании анализа различных типов лиганд-рецепторного взаимодействия известно, что специфичность этого процесса определяется небольшими участками пептидной цепи, которые имеют относительно жестко фиксированную пространственную структуру типа циклов, петель, β -изгибов и т. п. Образование в пептидной цепи β -изгибов в большинстве случаев является результатом взаимодействия рядом стоящих аминокислотных остатков и может наблюдаться уже для малых пептидов. Так, например, фрагмент *L*-Pro-Gly или *L*-Pro-*D*-Xxx, где Xxx — любая аминокислота, существует частично в виде β -изгиба типа II в растворах хлороформа и метанола [2]. Предполагается наличие β -изгиба типа I в метаноле для Gly-*L*-Pro-*L*-Asn-Gly [3]. На основе экспериментов с переносом насыщения [3] доказано присутствие свернутой структуры в водных растворах для Ac-*L*-Val-*L*-Pro-Gly-Gly-NHNH₂. В сильнополярных растворителях типа воды конформацию изгиба определяет не внутримолекулярная водородная связь (ВМВС), а внутримолекулярные электростатические и гидрофобные взаимодействия, так что наличие ВМВС является не причиной стабилизации, а следствием [4].

Химические сдвиги δ (м. д.) протонов СН трипептидов (I) - (VII)

Соедине- ние	Раствори- тель	Val ¹			Tur ²			Val ³			NCH ₃
		С α H	С β H	С γ H	С α H	С β H	-CH=	С α H	С β H	С γ H	
(I)	² H ₂ O	3,79	2,11	0,99	4,60	3,00; 2,90	6,80; 7,11	3,87	1,88	0,83	2,61
	Me ₂ SO	3,60	2,02	0,85; 0,88	4,59	2,88; 2,69	6,66; 7,07	4,04	1,94	0,78	2,55
(II)	² H ₂ O	3,79	2,10	0,99	4,67	3,00; 2,92	6,82; 7,13	3,74	1,87	0,59	2,67
	Me ₂ SO	3,61	2,04	0,87; 0,89	4,68	2,88; 2,82	6,66; 7,09	4,03	1,89	0,68	2,56
(III)	² H ₂ O	3,74	1,96	0,87; 0,91	4,65	3,01; 2,91	6,80; 7,13	3,95	1,96	0,75; 0,85	2,67
	Me ₂ SO	3,62	1,99	0,84	4,67	2,97; 2,60	6,63; 7,07	4,07	1,83	0,70; 0,51	2,57
(IV)	² H ₂ O	3,74	1,96	0,74; 0,86	4,67	3,03; 2,94	6,82; 7,15	3,87	1,96	0,79; 0,74	2,70
	Me ₂ SO	3,57	1,93	0,77	4,79	2,92; 2,63	6,63; 7,07	4,08	1,86	0,69; 0,52	2,57
(V)	² H ₂ O	3,81	2,20	0,99	4,53	3,02; 2,96	6,85; 7,14	3,70 *	-	-	2,65
	Me ₂ SO	3,62	2,07	0,90	4,40	2,89; 2,82	6,68; 7,08	3,62 *	-	-	2,56
(VI)	² H ₂ O	3,76	2,18	1,02	4,42 **	1,36 **	-	3,94	2,00	0,95; 0,93	2,71
	Me ₂ SO	3,64	2,02	0,97	4,48 **	1,28 **	-	4,11	1,96	0,87	2,61
(VII)	² H ₂ O	3,78	2,18	0,98	4,68 ***	3,06 ***; 3,04 ***	7,32 ***	3,89	2,11	0,83; 0,81	2,62

* ХС глицина. ** ХС алаина. *** ХС фенилаланина.

Химические сдвиги δ (м. д.) и температурные коэффициенты
 $(k = \frac{\Delta\delta}{\Delta T} \cdot 10^3 \text{ м. д./град})$ амидных протонов

Соединение	Растворитель	NH _{Tyr}		NH _{Val³}		NHCH ₃	
		δ	k	δ	k	δ	k
(I)	H ₂ O	8,68	7,5	7,92	6,5	7,25	3,0
	Me ₂ SO	8,56	1,8	8,05	6,8	7,58	4,5
(II)	H ₂ O	8,76	7,0	8,03	7,5	7,80	5,0
	Me ₂ SO	8,63	3,5	8,09	7,8	7,82	5,8
(III)	H ₂ O	8,69	7,0	8,12	6,0	7,78	6,5
	Me ₂ SO	8,63	2,3	8,16	6,5	7,89	5,3
(IV)	H ₂ O	8,90	8,0	8,42	8,5	8,08	6,5
	Me ₂ SO	8,63	2,3	8,32	8,0	8,01	5,3
(V)	H ₂ O	8,72	7,6	8,32	7,0	7,14	3,3
	Me ₂ SO	8,72	2,4	8,40	7,5	7,51	5,0
(VI)	H ₂ O	8,56	7,5	8,08	11,5	7,96	8,0
	Me ₂ SO	8,61	3,0	7,93	8,0	7,93	6,5
(VII)	H ₂ O	—	—	7,94	5,0	7,47	1,5

С целью понимания факторов, определяющих общую конформацию гормона ангиотензина, нами методом ЯМР исследован метиламид *L*-Val-*L*-Tyr-*L*-Val, его диастереомеры и некоторые модельные соединения. Были изучены спектры ¹H- и ¹³C-ЯМР, определены температурные коэффициенты для резонанса амидных протонов в H₂O и диметилсульфоксиде (Me₂SO) и константы спин-спинового взаимодействия (KССВ). Рассмотрено также изменение химических сдвигов (ХС) и КССВ в зависимости от рН среды. Отнесение сигналов в спектрах ¹H-ЯМР проведено методом двойного резонанса. В табл. 1 приведены ХС протонов СН для соединений:

- (I) *L*-Val¹-*L*-Tyr²-*L*-Val³-NHCH₃
- (II) *L*-Val-*L*-Tyr-*D*-Val-NHCH₃
- (III) *D*-Val-*L*-Tyr-*L*-Val-NHCH₃
- (IV) *L*-Val-*D*-Tyr-*L*-Val-NHCH₃
- (V) *L*-Val-*L*-Tyr-Gly-NHCH₃
- (VI) *L*-Val-*L*-Ala-*L*-Val-NHCH₃
- (VII) *L*-Val-*L*-Phe-*L*-Val-NHCH₃

Сравнение ХС диастереомеров заслуживает особого внимания, поскольку в литературе таких сведений относительно мало. Из многочисленных экспериментальных данных известно, что в олигопептидах с длиной цепи от 2 до 5 аминокислот расстояние между концами меньше, если в цепи содержится хотя одна аминокислота с *D*-конфигурацией [5]. Следовательно, замена *L*-остатка на *D*-остаток должна вызвать изменения углов ϕ и ψ пептидного остова. Кроме того, для дипептидов Leu-Tyr [6] и Ala-Tyr [7] все протоны неароматических боковых радикалов находятся в более сильном поле в диастереомерах с *D*, *L*-конфигурацией по сравнению с *L*, *L*-конфигурацией. Аналогичный факт наблюдается и в случае изученных нами пептидов (II)–(IV) по сравнению с пептидом (I). С другой стороны, в пептидах (I)–(V) и (VII) резонанс протонов группы CH₃ остатков Val¹ и Val³ находится в более сильных полях по сравнению с тако-

выми в соединении (VI). Это должно быть следствием анизотропного действия фенольного кольца. Характерно, что в водных средах эти различия более выражены для остатка Val³ [соединения (I), (II) и (VII)], тогда как в растворах Me₂SO различия для этих соединений сглаживаются.

В спектрах ¹H-ЯМР диастереомеров метиламидов Val-Tyr-Val ХС протонов NH заметно различаются (табл. 2). Протон NH метиламидной группы соединений (I), (II) и (VII) в водной среде находится в более сильном поле, чем у остальных соединений. Изучение температурной зависимости ХС резонанса протонов NH в воде показало, что изомер (I) имеет небольшой температурный коэффициент резонанса метиламидного протона, что свидетельствует об участии последнего в ВМВС. Такой же особенностью обладают спектры ¹H-ЯМР соединений (V) и (VII).

Вероятнее всего, причиной аномального экранирования амидного протона метиламидной группы соединений (I), (V) и (VII) является взаимное пространственное расположение пептидных связей при образовании β-изгиба типа 4→1. В таком случае экранирование резонанса NH остатка 4 осуществляется пептидной связью между остатками 2 и 3. Последняя расположена под прямым углом и своим анизотропным вкладом изменяет резонансные условия протона NH, участвующего в ВМВС типа 4→1. В пользу этого предположения говорят также небольшие температурные коэффициенты резонанса метиламидных протонов в соединениях (I), (V) и (VII).

Для идентификации карбонильных групп, вовлеченных в ВМВС, целесообразно исследовать влияние растворителя на ХС ¹³C группы С=О. Применяя этот подход, мы исследовали зависимость ХС ¹³C карбонильных групп при переходе от растворов в ²H₂O к Me₂SO. Наименьшие изменения в ХС наблюдались для С=О-группы остатка Val¹. Однако для различных аналогов трипептида имеет место заметная разница в величинах сдвига Δδ (рис. 1, табл. 3). При этом наблюдается симбатность между величинами температурных коэффициентов в спектрах ¹H-ЯМР и величиной сдвига Δδ для С=О-группы остатка Val¹ при переходе от воды к Me₂SO. Для соединений с малыми величинами температурных коэффициентов метиламидного протона [(I) и (V)] в воде в спектрах ¹³C также наблюдались меньшие изменения ХС карбонильной группы Val¹ по сравнению с пептидами, имеющими большие значения температурного коэффициента для метиламидного водорода [соединения (II)–(IV) и (VI)]. Этот результат также свидетельствует об образовании ВМВС между метиламидным протоном и группой С=О остатка Val¹ в соединениях (I), (V) и (VII) в H₂O.

Нами исследованы времена спин-решеточной релаксации T₁ для ядер ¹³C в соединениях (I) и (IV). Для диастереомера (I) наблюдаются меньшие времена релаксации T₁ C^α-углеродов и C^β-углерода остатка тирозина по сравнению с таковыми в соединении (IV) (табл. 4). В работе [8] показано, что в целой молекуле ангиотензина наблюдается заторможенное вращение боковой цепи остатка тирозина. Наши результаты по изучению T₁ свидетельствуют о сохранении в трипептиде (I) этой закономерности. Следовательно, времена спин-решеточной релаксации указывают на некоторую конформационную жесткость соединения (I) в водной среде.

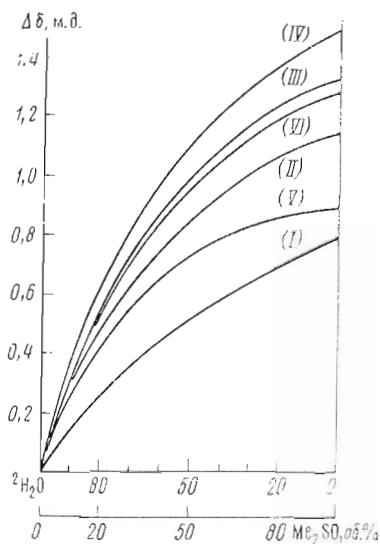


Рис. 1. Зависимость химических сдвигов ядер ¹³C С=О-группы Val¹ в трипептидах (I)–(VI) от растворителя ($\Delta\delta = \delta_{\text{H}_2\text{O}} - \delta_{\text{смеси}}$)

Химические сдвиги ^{13}C (δ , м. д.) трипептидов (I)–(VI)

Атомы углерода	(I)		(II)		(III)		(IV)		(V)		(VI)	
	Me ₂ SO	$^2\text{H}_2\text{O}$	Me ₂ SO	$^2\text{H}_2\text{O}$	Me ₂ SO	$^2\text{H}_2\text{O}$	Me ₂ SO	$^2\text{H}_2\text{O}$	Me ₂ SO	$^2\text{H}_2\text{O}$	Me ₂ SO	$^2\text{H}_2\text{O}$
Val ¹	C $^{\alpha}$	58,05	59,29	58,24	59,06	58,28	58,46	59,36	58,59	59,15	58,20	59,28
	C $^{\beta}$	30,95	30,92	30,92	30,06	30,62	30,62	30,41	30,88	30,97	30,84	30,79
	C $^{\gamma}$	19,49	18,41	19,36	18,32	19,75	19,27	18,19	19,36	18,54	19,27	17,72
	C=O	18,47	17,76	18,58	17,63	17,94	18,15	17,29	18,76	18,97	17,68	18,97
Tyr ²	C $^{\alpha}$	168,79	169,58	168,93	170,01	168,80	168,71	170,23	169,10	170,09	168,58	169,92
	C $^{\beta}$	55,71	56,34	56,08	56,69	55,61	55,65	56,21	56,30	56,82	56,30	56,82
	C $^{\gamma}$	37,60	37,40	37,96	36,84	—	38,61	37,40	37,31	36,75	37,31	36,75
	C $^{\delta}$	128,44	128,54	128,28	128,54	128,58	128,41	128,80	128,54	128,54	128,54	128,54
Val ³	C $^{\alpha}$	131,23	131,47	131,43	131,56	131,21	131,08	131,47	131,13	131,47	131,47	131,47
	C $^{\beta}$	116,02	116,45	116,11	116,71	115,98	115,94	116,71	116,20	116,45	116,20	116,45
	C $^{\gamma}$	157,03	155,51	157,11	155,68	157,19	157,11	155,58	157,41	155,55	157,41	155,55
	C=O	172,04	173,63	172,17	174,67	172,47	172,34	174,74	172,04	173,98	172,04	173,98
Gly	C $^{\alpha}$	59,16	60,31	59,23	60,70	59,79	59,58	60,87	59,10	60,79	59,10	60,79
	C $^{\beta}$	31,53	31,10	31,44	30,97	31,40	31,44	30,71	31,79	30,92	31,79	30,92
	C $^{\gamma}$	20,29	19,49	20,44	19,01	20,31	20,22	19,06	19,27	18,76	19,27	18,76
	C=O	19,38	18,41	19,01	17,85	19,23	19,45	18,37	18,97	18,50	18,97	18,50
Ala	C $^{\alpha}$	171,72	172,90	171,69	173,80	172,08	171,78	174,47	172,47	174,07	172,47	174,07
	C $^{\beta}$	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	C=O	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	N-CH ₃	26,47	26,61	26,44	26,57	26,44	26,61	26,57	26,57	26,83	26,39	26,52

Времена спин-решеточной релаксации T_1 (с) ядер ^{13}C в $^2\text{H}_2\text{O}$ при 50°C

Соединение	$\text{C}^\alpha(\text{Val}^1)$	$\text{C}^\alpha(\text{Tyr})$	$\text{C}^\alpha(\text{Val}^2)$	$\text{C}^\beta(\text{Tyr})$	$\text{C}^{\delta,\epsilon}(\text{Tyr})$	$\text{N}-\underline{\text{CH}_2}$
(I)	0,68	0,62	0,64	0,30	0,71	1,02
(IV)	0,82	0,70	0,74	0,63	1,09	0,90

Таблица 5

Константы спин-спинового взаимодействия (Гц) трипептидов (I)–(VII)

Соединение	Растворитель	Val ¹	Tyr			Val ²		Остальные
		$^3J_{\text{HNC}^\alpha\text{C}^\beta\text{H}}$	$^3J_{\text{HNC}^\alpha\text{H}}$	$^3J_{\text{HNC}^\alpha\text{C}^\beta\text{H}}$	$^2J_{\text{HNC}^\beta\text{H}}$	$^3J_{\text{HNC}^\alpha\text{H}}$	$^3J_{\text{HNC}^\alpha\text{C}^\beta\text{H}}$	
(I)	H ₂ O	5,5	7,0	6,5; 9,4	13,8	8,8	8,0	10,8 ^а ; 16,5 ^б 9,2 ^а 5,0 ^в 7,0 ^а
	Me ₂ SO	5,0	7,2	5,8; 7,8	14,0	8,4	7,0	
(II)	H ₂ O	5,4	4,0	6,4; 9,4	12,8	8,2	6,6	
	Me ₂ SO	4,8	6,9	6,0; 7,8	—	9,0	6,4	
(III)	H ₂ O	5,2	7,6	6,4; 8,8	13,4	8,2	8,0	
	Me ₂ SO	4,6	8,1	4,4; 10,0	14,0	8,2	7,0	
(IV)	H ₂ O	5,0	7,1	6,8; 8,4	13,6	7,0	6,8	
	Me ₂ SO	4,4	8,8	5,0; 9,6	13,4	8,8	6,8	
(V)	H ₂ O	5,4	5,6	6,8; 8,8	13,2	—	—	
	Me ₂ SO	5,0	6,6	5,0; 7,2	14,4	—	—	
(VI)	H ₂ O	5,6	—	—	—	7,0	7,4	
	Me ₂ SO	5,4	—	—	—	8,6	6,9	
(VII)	H ₂ O	5,9	—	6,4 ^г ; 9,1 ^г	13,2 ^г	8,8	8,3	

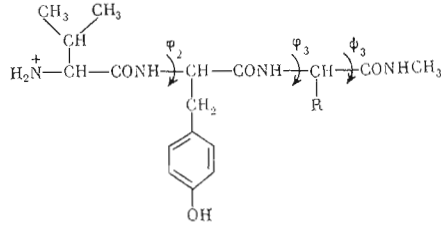
^а $^3J_{\text{HNC}^\alpha\text{H}}$ глицина. ^б $^2J_{\text{HNC}^\alpha\text{H}}$ глицина. ^в $^3J_{\text{HNC}^\alpha\text{H}}$ аланина. ^г КССВ фенилаланина.

Использование вицинальных КССВ для определения углов главной пептидной цепи и ориентации боковых цепей позволяет получить подтверждение свернутой структуры в водных растворах.

Экспериментально определенные КССВ соединений (I)–(VII) приведены в табл. 5. Методом селективного межъядерного двойного резонанса нами определены также следующие КССВ (Гц) для остатка Val¹ в соединении (I): $^3J_{\text{HNC}^\alpha\text{C}^\beta\text{H}}$ 0,7, $^3J_{\text{HNC}^\alpha\text{H}}$ 2,6 и $^2J_{\text{HNC}^\alpha\text{H}}$ 3,1. В обогащенном изотопом ^{15}N соединении Val-Tyr-Val- ^{15}N HCN₃ было найдено, что $^3J_{\text{HNC}^\alpha\text{C}^\beta\text{H}} \leq 1$. Возможные углы ϕ и ψ главной цепи для пептидов (I) и (V) найдены согласно работе [9] и сопоставлены с теоретическими данными для β -изгибов [10] и вытянутой структуры (табл. 6). Как видно, экспериментально найденные значения углов ϕ и ψ в обоих трипептидах лучше согласуются с теоретически оцененными углами в β -изгибе. Таким образом, мы склонны считать, что в воде в кислой среде трипептиды (I), (V) и (VII) образуют β -изгиб.

По величинам КССВ $^3J_{\text{HNC}^\alpha\text{C}^\beta\text{H}}$ с использованием стандартных значений [11] для $^3J_{\text{HNC}^\alpha\text{C}^\beta\text{H}}$ в *гош*- и *транс*-формах нами определены соотношения ротамеров в воде и Me₂SO (табл. 7). Согласно методике [12], КССВ $^3J_{\text{HNC}^\alpha\text{C}^\beta\text{H}}$ позволила нам определить содержание ротамера с χ' 60°, равным 0,03 для остатка Val¹ в пептиде (I) в H₂O. Как видно из табл. 7, H₂O оказывает существенное ориентирующее влияние на распределение ротамеров относительно связей в соединениях (I), (II) и (V).

Теоретически и экспериментально определенные углы главной цепи



R	Угол	Экспериментальный ($\pm 15^\circ$), град	Теоретический, град		КССВ, из которых получена информация
			β -изгиб	вытянутая	
$\begin{array}{l} \text{---CH} \\ \diagup \text{CH}_3 \\ \diagdown \text{CH}_3 \end{array}$	φ_2	-85; -155	-80	-120	${}^3J_{\text{HNC}^\alpha\text{H}}$; ${}^3J_{\text{isC}'\text{NC}^\alpha\text{H}}$
	φ_3	-95; -140	-90	-120	${}^3J_{\text{HNC}^\alpha\text{H}}$
	ψ_3	10; 70; 170	~ 0	140	${}^3J_{\text{isNC}'\text{C}^\alpha\text{H}}$
-H	φ_2	-75; -165	-80	-120	${}^3J_{\text{HNC}^\alpha\text{H}}$
	φ_3	-60; -140	-80	-120	$\Sigma J_{\text{HNC}^\alpha\text{H}}$
	ψ_3	30; 160	20	140	${}^2J_{\text{HC}^\alpha\text{H}}$

Таблица 7

Распределение ротамеров боковых цепей

Соединение	Растворитель	Val ¹	Tyr			Val ²
		χ_1 180°	χ_1 * 180°	χ_1 * -60°	χ_1 60°	χ_1 180°
(I)	H ₂ O	0,27	0,36	0,62	0,02	0,49
	Me ₂ SO	0,22	0,29	0,57	0,14	0,40
(II)	H ₂ O	0,26	0,35	0,62	0,03	0,36
	Me ₂ SO	0,20	0,31	0,48	0,21	0,35
(III)	H ₂ O	0,24	0,35	0,56	0,09	0,49
	Me ₂ SO	0,18	0,16	0,68	0,16	0,40
(IV)	H ₂ O	0,22	0,38	0,09	0,53	0,38
	Me ₂ SO	0,16	0,22	0,14	0,64	0,38
(V)	H ₂ O	0,26	0,38	0,57	0,05	-
	Me ₂ SO	0,22	0,22	0,51	0,27	-
(VI)	H ₂ O	0,27	-	-	-	0,44
	Me ₂ SO	0,26	-	-	-	0,39
(VII)	H ₂ O	0,30	0,35 **	0,59 **	0,06 **	0,52

* Отнесение может быть обратным.

** Ротамеры фенилаланина.

Боковые цепи остатков Val¹ и тирозина в H₂O имеют четко выраженную тенденцию ориентироваться преимущественно в сторону N-конца. Причины этого не совсем ясны, однако в работе [13] указывается на зависимость ориентации боковой цепи фенилаланина от диэлектрической проницаемости среды. При этом найдено, что с увеличением полярности среды неравномерность распределения ротамеров фенилаланина увеличивается.

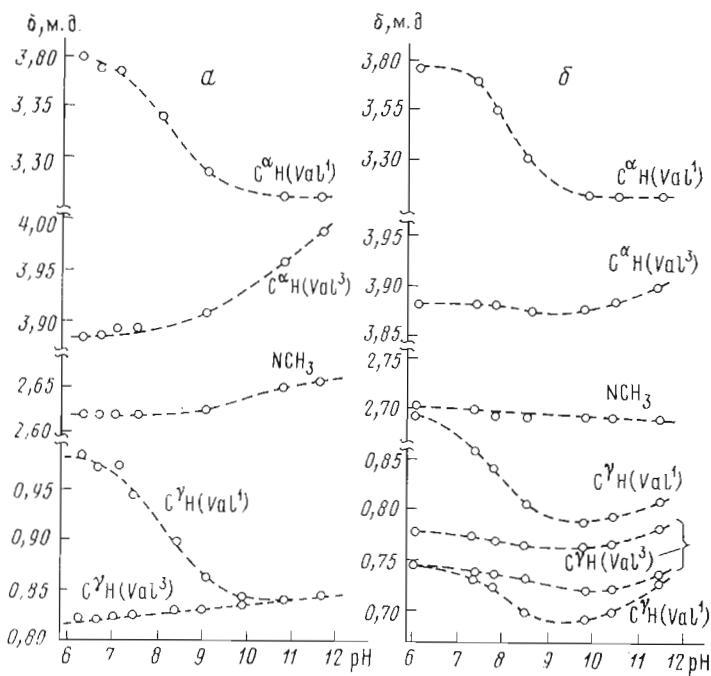


Рис. 2. Кривые титрования в спектрах ^1H трипептидов: а — $L\text{-Val-L-Tyr-L-Val-NHCH}_3$ (I), б — $L\text{-Val-D-Tyr-L-Val-NHCH}_3$ (IV)

Выравнивание населенности ротамеров в Me_2SO в свою очередь оказывает влияние на конформацию остова пептидной цепи. Об этом свидетельствуют как КССВ $^3J_{\text{NHCAH}}$, так и температурные коэффициенты резонансных сигналов протонов NH. Низкое значение температурного коэффициента для протона NH остатка тирозина в Me_2SO , по-видимому, обусловлено поляризационным влиянием заряженной N-концевой аминогруппы, заряд которой в H_2O частично скомпенсирован сольватационной оболочкой молекул растворителя.

Таким образом, экспериментальные данные говорят о свернутой структуре метиламида $L\text{-Val-L-Tyr-L-Val}$ в водных растворах. На рис. 2 показаны результаты титрования соединений (I) и (IV), один из которых имеет преобладающую конформацию в воде, а другой нет. Протопирование α -аминогруппы вызывает одинаковые сдвиги протонов $\text{C}^\alpha\text{H Val}^1$ в соединениях (I) и (IV). Различное поведение протонов $\text{C}^\gamma\text{H Val}^1$ при титровании (рис. 2) отражает, очевидно, разное распределение ротамеров относительно связи $\text{C}^\alpha\text{-C}^\beta$ (табл. 7). Метильные группы Val^1 мало чувствительны к изменениям pH в обоих пептидах. Относительно большее изменение ХС C^αH для остатка Val^3 и протонов N-CH_3 в соединении (I) по сравнению с (IV) в области pH 9–12, вероятно, свидетельствует о том, что ионизация гидроксильной группы тирозина вызывает разупорядочение пространственной структуры пептида. Причины стабилизирующего действия воды на конформацию пептидной цепи в настоящее время неясны. Вероятно, ее роль заключается в стабилизации таких конформаций молекулы, при которых возможна максимальная сольватация пептидных связей. Об этом свидетельствует ряд литературных данных [14]. Безусловно, важное значение имеют также гидрофобные взаимодействия боковых радикалов аминокислот.

Можно полагать, что и средняя часть целой молекулы гормона в водной среде также имеет тенденцию к увеличению доли такой стабильной конформации, которая является энергетически наимыгоднейшей. Однако та-

Физико-химические константы соединений (V)–(VIII)

Соединение	Структура	Т. пл., °С	$[\alpha]_D^{20}$, в 1 н. CH_3COOH	E_{His} , 1 н. CH_3COOH , рН 2,4	R_f в системах	
					А	Б
(V)	Val-Tyr-Gly-NHCH ₃	96–9	+20,5	0,72	0,45	0,55
(VI)	Val-Ala-Val-NHCH ₃	290–295 (разл.)	–61,4	0,76	0,43	0,45
(VII)	Val-Phe-Val-NHCH ₃	252–253	–4,2	0,69	0,53	0,57
(VIII)	Val-Tyr-Val- ¹⁵ NHCH ₃	238–239	+0,4	0,70	0,57	0,60

Примечание. Температуры плавления определены в открытых капиллярах без коррекции; удельное оптическое вращение измерено на цифровом поляриметре (модель 141 фирмы «Perkin Elmer»).

кая структура может оказаться весьма напряженной в липофильном окружении. В таком случае это приведет к определенному активному воздействию молекулы гормона на рецептор и соответственному генерированию сигнала.

Экспериментальная часть

Спектры ¹H- и ¹³C-ЯМР получали на спектрометре WH-90/DS (Bruker-Physik, ФРГ) при рабочих частотах 90 и 22,63 МГц соответственно и концентрации растворов 0,15 М для ядер ¹³C и 0,02 М для ¹H. Спектры ¹³C-ЯМР измеряли при 42°С, среднее число накоплений 3000. Химические сдвиги ядер ¹³C измеряли относительно диоксана как внутреннего стандарта и пересчитывали относительно ТМС по соотношению $\delta_{\text{ТМС}} = \delta_{\text{диоксан}} + 67,61$ м.д. Точность измерения составляла: $\pm 0,1$ м.д. для ¹³C и $\pm 0,01$ для ¹H. Для ядер ¹H в качестве внутреннего стандарта в воде использовали *tert*-бутанол (δ 1,23 м.д.) и в Me₂SO – гексаметилдисилоксан (δ 0,05 м.д.). Точность измерения КССВ $\pm 0,2$ Гц. Для определения углов φ использовались скорректированные на электроотрицательность заместителей значения КССВ, согласно формуле $J_{\text{корр}} = 1,09 \cdot J_{\text{эсп}}$.

Спектры ¹H-ЯМР в H₂O записывали с помощью импульсного подавления сигнала воды. Генератор подавляющей частоты включали за 2 с до начала возбуждающего импульса, накопление сигнала происходило при отсутствии облучающего поля. Для стабилизации резонансных условий в растворе H₂O добавлено несколько капель ацетона-d₆. Температурные коэффициенты определяли в диапазоне 20–60°С.

Времена спин-решеточной релаксации T_1 определяли, используя импульсную последовательность типа $(180^\circ - \tau - 90^\circ - T_\infty)_n$, где $T_\infty = 4,0$ с. T_1 рассчитывали из уравнения $\ln(A_\infty - A_\tau) = \ln 2A_\infty - \tau T_1^{-1}$ [15], где A_τ – начальная амплитуда индуцированного сигнала после 90-градусного импульса, приложенного в момент τ , а A_∞ – предельное значение при τ 4,0 с. Точность определения $T_1 \pm 10\%$.

Титрование проведено добавлением 1 М NaO²N. pH раствора определяли с помощью комбинированного стеклянного электрода на pH-метре типа ОР-208 (Radelkis, Венгрия). Приведенные в работе значения pH соответствуют показаниям pH-метра в ²H₂O.

Использованные в работе соединения синтезированы нами классическими методами пептидной химии. Часть из них [соединения (I)–(IV)] описаны ранее [16]. Соединения (V), (VII) и (VIII) получены азидным сочетанием бензилоксикарбонил-Val-Tyr или бензилоксикарбонил-Val-Phe с метиламидом глицина [соединение (V)], метиламидом валина [соединение (VII)] или ¹⁵N-меченым метиламидом валина [соединение (VIII)]

с последующим каталитическим гидрогенолизом над палладиевой чернью. Соединение (VI) получено конденсацией карбодиимидным методом метиламида валина с *трет*-бутоксикарбонилаланином и, после снятия N-защитной группы раствором HCl в этаноле, с бензилоксикарбонилвалином с последующим каталитическим гидрогенолизом над палладиевой чернью. Электрофорез осуществлен на бумаге FN-16 (Filtrak, ГДР). Для ТСХ на пластинках «Kieselgel 60F 254» с толщиной слоя 0,2 мм (Merck) применены системы: *n*-бутанол — уксусная кислота — вода, 4:1:1 (А) и *n*-бутанол — пиридин — вода, 65:35:20 (Б).

ЛИТЕРАТУРА

1. Chipens G., Ancan J., Afanasyeva G., Balodis J., Indulen J., Klusha V., Kudryashova V., Liepinsh E., Makarova N., Mishlyakova N. (1976) Peptides 1976. Proceedings of the Fourteenth European Peptide Symposium. Wepion. Belgium, p. 353.
2. Kopple K. D., Go A., Pilipauskas D. R. (1975) J. Amer. Chem. Soc., 97, 6830—6838.
3. Kopple K. D., Go A. (1976) Biopolymers, 15, 1701—1715.
4. Grathwohl Ch., Wüthrich K. (1976) Biopolymers, 15, 2043—2057.
5. Anteunis M. J., Becu C., Lala A. K., Verhogge G., Narayan-Lala K. (1977) Bull. Soc. chim. belg., 86, 161—186.
6. Bovey F. A., Tiers G. V. D. (1959) J. Amer. Chem. Soc., 81, 2870—2878.
7. Wieland T., Bende H. (1965) Chem. Ber., 98, 504—515.
8. Deslauriers R., Paiva A. C. M., Schaumburg K., Smith J. C. P. (1975) Biochemistry, 14, 878—886.
9. Bystrov V. F. (1976) Progress in NMR Spectroscopy, 10, 41—81.
10. Venkatachalam C. M. (1968) Biopolymers, 6, 1425—1436.
11. Pachler K. G. R. (1964) Spectrochim. acta, 20, 581—587.
12. Hansen P. E., Feeney J., Roberts G. C. K. (1975) J. Magn. Res., 17, 249—261.
13. Kobayashi J., Nagai U. (1977) Tetrahedron Lett., 21, 1803—1804.
14. Wolfenden R. (1978) Biochemistry, 17, 201—204.
15. Фаррар Т., Беккер Э. (1973) в кн.: Импульсная и фурье-спектроскопия ЯМР, с. 45, «Мир», М.
16. Анцанс Ю. Е., Кудряшова В. В., Чипенс Г. И. (1977) Изв. АН ЛатвССР. Сер. хим., 4, 498—499.

Поступила в редакцию
29.X.1979

После доработки
17.II.1980

NMR STUDIES ON SPATIAL STRUCTURE OF *L*-Val-*L*-Tyr-*L*-Val METHYLAMIDE AND ITS DIASTEREOMERS

SEKACIS J. P., LIEPINSH E. E., ANSANS Yu. E.,
BERGA D. A., CHIPENS G. I.

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

The ^1H and ^{13}C NMR spectra of the *L*-Val-*L*-Tyr-*L*-Val diastereomers and some model compounds have been analyzed. The temperature dependence of the peptide NH chemical shifts, solvent dependence of the peptide C=O chemical shifts and the values of the spin-spin coupling constants indicate a considerable contribution of the β -turn type I into the averaged conformation of *L*-Val-*L*-Tyr-*L*-Val-NHCH₃ in aqueous solution. The side-chain rotamer populations in tripeptides vary with the solvents. The spin-lattice relaxation times for ^{13}C nuclei point to more restricted mobility of the tyrosine ring in *L*-Val-*L*-Tyr-*L*-Val-NHCH₃ as compared with the *L*-D-*L* isomer.